

# **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"**



**FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA**

**Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie  
Sezione di Clinica Medica**

**Dottorato di Ricerca in Scienze Cliniche e Farmaco-  
Tossicologiche Veterinarie**  
(Coordinatore: Prof. Paolo Ciaramella)

**Valutazione del Peptide Natriuretico Atriale (proANP 31-67),  
del Peptide Natriuretico di tipo B (nt-proBNP) e dell'Endotelina (ET1)  
in cani affetti da malattia degenerativa cronica della valvola mitrale a  
diverso stadio clinico**

**Docente guida:**

Ch.mo Prof.: Laura Cortese

**Tesi di Dottorato della:**

Dott.ssa Grazia Brignola

XX DOTTORATO DI RICERCA  
A. A. 2007-2008

## **Indice**

**Premessa** pag. 3

**Meccanismi dello scompenso cardiaco** pag. 7

**Endocardiosi Mitralica** pag. 33

**I peptidi natriuretici** pag. 54

**Fattori vasoattivi di origine endoteliale: Endotelina (ET1)** pag. 66

**Citochine proinfiammatorie** pag. 78

## **Parte Sperimentale**

**Materiali e Metodi** pag. 82

**Risultati** pag. 92

**Discussioni e Conclusioni** pag. 100

**Bibliografia** pag. 107

## **Premessa**

Le patologie cardiache nel loro insieme costituiscono oggi, nell'ambito della pratica clinica veterinaria, soprattutto dei piccoli animali, un importante settore in continua e rapida evoluzione. Da un lato, l'utilizzo sempre più frequente delle tecnologie diagnostiche a supporto dell'attività clinica in campo cardiovascolare, ha consentito di raggiungere obiettivi un tempo impensati con la possibilità di diagnosticare precocemente attraverso indagini strumentali e di laboratorio la malattia cardiaca, dall'altro il costante impegno da parte del mondo scientifico ha portato non solo alla conoscenza di diversi fattori, diretti o indiretti, responsabili di danno miocardico, ma anche degli intimi meccanismi attraverso cui si giunge al rimodellamento del miocardio e alla disfunzione sisto-diastolica. Con le nostre indagini,

che formano l'oggetto della presente tesi di dottorato, si è voluto verificare, attraverso la valutazione di animali colpiti da malattia degenerativa cronica della valvola mitrale a diverso stadio clinico (secondo la classificazione ISACHC), l'andamento dei livelli plasmatici di alcuni peptidi vasoattivi, quali il fattore natriuretico di derivazione atriale (ANP), il fattore natriuretico di derivazione cerebrale (BNP) e l'endotelina 1 (ET1), al fine di comprenderne il significato clinico-diagnostico e prognostico nella progressione della patologia cardiaca.

Gli animali arruolati nel presente studio, sono stati esaminati durante l'attività clinica svolta presso la sezione di Clinica Medica del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie del nostro Ateneo, nel corso degli ultimi tre anni. In campo umano, com'è noto, il dosaggio dei peptidi natriuretici, soprattutto del BNP, è entrato a far parte stabilmente della pratica clinica cardiologica già da tempo, quale

importante strumento diagnostico e prognostico. Sempre in campo umano, oggi, si tende a focalizzare l'attenzione su un altro fattore vasoattivo, l'ET1, peptide di derivazione endoteliale dotato di una potente azione vasocostrittrice che sembra avere consistenti effetti sul meccanismo di rimodellamento cardiaco. Anche nell'ambito della Medicina Veterinaria, e più specificamente nella specie canina, l'innalzamento dei valori plasmatici di tali peptidi in corso di scompenso cardiaco è stato ampiamente documentato, soprattutto per quanto riguarda il Peptide Natriuretico Atriale (ANP), ma resta tutt'ora non ancora sufficientemente definita l'utilità clinica della loro determinazione.

La descrizione dei risultati del presente studio sarà preceduta da una breve trattazione sui meccanismi dello scompenso cardiaco, sulla malattia mitralica e sui fattori neurormonali implicati.

## **Meccanismi dello scompenso cardiaco**

Lo scompenso cardiaco si può definire come una patologia a carattere progressivo in cui si verifica un deterioramento della struttura e della funzione cardiaca. Sul piano fisiopatologico lo scompenso si traduce nella incapacità del cuore ad adeguare la portata al variare dei fabbisogni metabolici tissutali e si esprime con un corteo sintomatologico diverso a seconda del tipo di scompenso e della gravità della cardiopatia che ne è all'origine. L'insufficienza cardiaca è ben distinta dall'insufficienza circolatoria, in cui la causa dell'inadeguata portata dipende da un'anomalia propria di qualche componente dell'apparato circolatorio. Nella maggior parte dei casi lo scompenso è associato a disfunzione sistolica del ventricolo sinistro, pur essendo frequente la concomitante presenza di una disfunzione diastolica.



Anche condizioni quali la stenosi tricuspidale o mitralica e la pericardite costrittiva, che ostacolano il riempimento cardiaco, possono portare ad insufficienza pur in assenza di deficit contrattile del miocardio. Eventi quali la presenza di ipertensione arteriosa, ipertrofia miocardica e fibrosi, svolgono un ruolo fondamentale nel determinismo della disfunzione ventricolare. I meccanismi di compenso o di adattamento a “breve termine” messi in atto dal sistema, sono rappresentati fondamentalmente dal meccanismo di Frank-Starling, in cui aumentando il precarico, cioè il volume telediastolico, si ha un incremento della funzione ventricolare e dall’attivazione dei sistemi neuro ormonali. La noradrenalina (NE) viene rilasciata dai nervi del sistema adrenergico cardiaco ed oltre ad aumentare la contrattilità del cuore, innesca l’attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone e di altri fattori che tentano di mantenere nei range fisiologici la

pressione arteriosa e la perfusione degli organi vitali. L'ipertrofia miocardica, con o senza dilatazione, il conseguente aumento del tessuto contrattile ed il rimodellamento cardiaco, rappresentano, invece, i meccanismi di adattamento che intervengono più lentamente. La risposta morfologica del miocardio ad un sovraccarico emodinamico dipende dalla natura dello stimolo. Le possibili risposte a livello cellulare, infatti, possono essere di due tipi. In primo luogo il persistente sovraccarico volumetrico, a causa dell'incremento della tensione diastolica della parete, induce a livello miocardico un allungamento delle fibrocellule secondo un meccanismo di replicazione dei sarcomeri disposti in serie e quindi, una ipertrofia di tipo eccentrico. Se invece il sovraccarico è di tipo pressorio, come può avvenire ad esempio in corso di ipertensione sistemica o stenosi aortica, si verifica un aumento della tensione sistolica della parete, con replicazione in parallelo dei

sarcomeri ed allargamento delle cellule miocardiche con conseguente ipertrofia concentrica (Braunwald., 2004). In entrambi i casi, almeno inizialmente, vi è un aumento del numero di mitocondri al fine di incrementare le riserve di ATP. Questi meccanismi spiegano perchè nel sovraccarico volumetrico c'è dilatazione ventricolare più che aumento di spessore parietale, mentre accade il contrario in corso di sovraccarico pressorio, dove prevale l'aumento di spessore delle pareti. Probabilmente questo incremento mitocondriale fornisce i fosfati a contenuto energetico elevato, necessari per far fronte alle aumentate richieste energetiche delle cellule ipertrofiche. Tutto ciò si accompagna anche ad un aumento della massa di miofibrille. Le modificazioni che intervengono nei miociti, sono, inoltre, accompagnate da alterazioni quantitative e qualitative del collagene presente a livello della matrice extracellulare (MEC) e conducono al rimodellamento, riattivando fattori

di crescita presenti normalmente nel tessuto cardiaco embrionale ma quiescenti nel paziente adulto sano. Quindi, il passaggio dalla fase di ipertrofia compensatoria, che inizialmente mantiene il sistema in condizioni di equilibrio, alla fase successiva di insufficienza del miocardio, implica una serie di eventi che si producono a livello cellulare e molecolare. Il primo di essi è l'ipertrofia del miocita, con variazione di fenotipi che riportano l'espressione genetica fetale in vantaggio rispetto a quella propria dell'adulto. In aggiunta a ciò si verifica un'alterazione nell'espressione delle proteine coinvolte nel meccanismo di eccitazione-contrazione, necrosi, apoptosi e variazione della matrice extracellulare (MEC). La necrosi avviene quando la cellula cardiaca non è più in grado di mantenere l'integrità della membrana cellulare, favorendo l'ingresso di liquido dal comparto extracellulare e quindi il rigonfiamento e l'attivazione di enzimi

proteolitici che ne causano la lisi. La morte per necrosi stimola una reazione flogistica con attivazione dei fibroblasti, deposizione di collagene e fibrosi che si può definire riparativa. Nell'infarto del miocardio la necrosi è localizzata, mentre è diffusa nella forme dilatative o laddove, ad esempio, ci sia stato un danno provocato da sostanze tossiche, o ancora in corso di miocardite. L'apoptosi, che letteralmente significa morte cellulare programmata, a differenza della necrosi è un processo dettato da uno specifico programma genetico, mediato da energia, che conduce all'attivazione di una cascata molecolare che provoca la degradazione del DNA nucleare, con morte cellulare seguita da fagocitosi da parte delle cellule vicine, senza provocare reazione flogistica. L'apoptosi è un meccanismo cellulare comune, che si esprime sia durante l'organogenesi, sia nelle cellule adulte sottoposte ad un rapido turn over (cellule ematiche, epitelio

intestinale ecc.), per cui, essendo i cardiomiociti cellule altamente differenziate, si è cercato di capire come essi potessero andare incontro ad apoptosi, fenomeno largamente osservato nei pazienti umani. In effetti molti sono i fattori che notoriamente sono coinvolti nel determinismo dell'apoptosi: le catecolamine, l'angiotensina II, il nitrossido (NO), le citochine proinfiammatorie e lo stress meccanico. Lo stress parietale indotto dalla disfunzione cardiaca, si esprime non solo a carico dei cardiomiociti, ma coinvolge anche la matrice extracellulare (MEC), struttura lungo la quale sono allineati i miociti. La quantità e la natura del collagene della MEC sono determinate dal bilancio tra la sintesi e la sua degradazione, ad opera di due famiglie di enzimi contrapposte: le metalloproteinasi della matrice (MMP), enzimi preposti alla degradazione e gli inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMP), che si oppongono alle MMP. Queste molecole intervengono,

dunque, nella riorganizzazione dinamica della matrice, dove anche i fibroblasti cardiaci hanno un ruolo fondamentale poiché, oltre a sintetizzare i peptici natriuretici, sono deputati da un lato alla sintesi di collagene e proteine della matrice, e dall'altro alla collagenolisi tramite, appunto, la secrezione delle MMP. La deplezione del collagene strutturale, in seguito all'azione delle MMP, provoca una dilatazione delle camere cardiache, con “slittamento” dei cardiomiociti. In particolare, il sovraccarico ventricolare condiziona un afflusso di mastociti, un aumento di metalloproteinasi (MMP 9 gelatinasi, MMP 1 collagenasi, e MMP 3) e parallelamente un calo delle proteine tissutali inibenti le MMP, TIMP. La conseguenza di questo meccanismo è una rapida perdita di MEC, per lisi delle fibre collagene, un aumento del diametro del ventricolo e una riduzione della contrattilità. Inoltre, i fibroblasti cardiaci sintetizzano BNP, ad azione modulatrice ed

antifibrotica. Nelle fasi avanzate di sovraccarico è possibile evidenziare anche l'iperplasia delle fibrocellule miocardiche nelle quali, l'aumento della secrezione di catecolamine (adrenalina e noradrenalina) tentano di aumentarne la contrattilità e quindi l'efficienza e soprattutto, nelle fasi avanzate di scompenso, l'attivazione di una complessa serie di fattori neuroendocrini risulta cruciale per il mantenimento del sistema in toto. Questi sistemi possono essere schematicamente suddivisi in base alla diversa azione sul tono vascolare e sul meccanismo di diuresi e natriuresi. Alcuni di essi sono ormoni circolanti (effetto endocrino), altri agiscono su cellule differenti, ma comunque vicine (effetto paracrino), oppure sulla stessa cellula secernente (effetto autocrino). Il primo gruppo include il **sistema renina-angiotensina-aldosterone** (SRAA), la **vasopressina** (ADH) e l'**endotelina**, i cui effetti finali sono rappresentati dalla vasocostrizione con ritenzione di sodio e di acqua.



L'altro gruppo comprende il fattore natriuretico atriale e le prostaglandine, ad azione vasodilatatrice e diuretica. Tali meccanismi di regolazione sono il risultato dell'attivazione del sistema nervoso autonomo e del controllo ormonale, esercitando la loro influenza sulla contrattilità, sulla frequenza cardiaca, sul tono vascolare e sulla perfusione dei vari distretti dell'intero organismo (Kittleson, 1999). Nel comparto cardiopolmonare sono presenti dei recettori a bassa pressione, sensibili alle variazioni volumetriche centrali, mentre a livello renale nel seno carotideo e nell'arco aortico sono presenti recettori ad alta pressione, che rispondono alle variazioni della pressione sistemica.

Secondo una possibile classificazione tutti questi recettori costituiscono la cosiddetta "branca afferente" del sistema di regolazione, cioè sono in grado di percepire le variazioni pressorie e/o di volume in alcuni distretti cruciali, ad esempio il comparto cardio-polmonare e quello

arterioso centrale. Allo stesso modo la “branca efferente” di tale sistema è rappresentata dai fattori neuroendocrini, prodotti in risposta agli stimoli percepiti dai recettori periferici ed elaborati attraverso un “centro integratore” del sistema nervoso centrale.

Le variazioni della volemia sono generalmente percepite sia dai recettori ad alta che da quelli a bassa pressione; nel caso in cui l'insufficienza cardiaca sia dovuta ad una disfunzione eiettiva ventricolare sinistra, i recettori aortici e carotidei ad alta pressione rileveranno un deficit volumetrico, al contrario di quanto avverrà per i recettori a bassa pressione, che rileveranno un aumento di volume circolante. Il risultato di ciò sarà, quindi, che la risposta dei recettori ad alta pressione prevarrà sui recettori a bassa pressione, con l'attivazione dei meccanismi neuro ormonali di tipo vasocostrittore, di ritenzione idrico-salina e conseguente aumento del volume circolante (Martin,

2003). Durante i primi stadi dell'insufficienza cardiaca tali modificazioni hanno un ruolo importante nel meccanismo di compenso della volemia e della pressione, ma a lungo andare la persistente vasocostrizione, l'aumentato lavoro del cuore (aumento del post-carico) e l'eccessiva ritenzione idrico-salina peggiorano lo scompenso cardiaco, innescando un meccanismo autoaggravante (Braunwald, 1991). In questa fase l'azione negativa della vasocostrizione non viene più antagonizzata dagli effetti di un altro gruppo di fattori, quali ANF, le prostaglandine, presenti a livello plasmatico in concentrazioni molto elevate (Dei Cas, 1993).

Tra i fattori ad azione vasodilatatrice, inoltre, svolgono un ruolo importante il nitrossido, la cui molecola deriva dalla degradazione della L-arginina e si caratterizza per la brevissima emivita (1-3 secondi) e la Prostaciclina  $PGI_2$ , come derivato dell'acido arachidonico, di cui sono

note l'attività vasodilatatrice ed antiaggregante piastrinica (Taddei et al., 2006).

L'insufficienza ventricolare sinistra e la conseguente ridotta gittata cardiaca provocano un deficit della perfusione renale con attivazione neuro ormonale: si innesca in questa fase una stimolazione simpatica che induce tachicardia e vasocostrizione, mediata inoltre da meccanismi paracrini e dal rilascio di Endotelina (ET-1), Angiotensina II (AT II), Prostanoidi ed altri fattori, attivati contestualmente al SRAA.

Il ridotto flusso renale comporta ridotta velocità di filtrazione glomerulare (GFR) e conseguente ritenzione idrico-salina con aumento del tasso di urea ed inoltre, per opera del SRAA aumenta anche la frazione di filtrazione, la sete e l'ADH.

L'importanza della valutazione dei fattori neuroendocrini in corso di malattia cardiaca, può essere considerata come un valido supporto alla

diagnosi precoce oltre che come un importante segno prognostico e terapeutico. La loro presenza nel torrente ematico in concentrazioni che riflettono lo stadio di progressione della malattia cardiaca, può contribuire alla formulazione della diagnosi e all'instaurazione di un protocollo terapeutico adeguato (Haggstrom et al., 1996; Martin, 2003; Moesgaard et al., 2005; De Francesco et al., 2007).

## SISTEMA NERVOSO AUTONOMO

Nell'ambito dei meccanismi di controllo della funzione cardiovascolare il Sistema Nervoso Adrenergico svolge un ruolo primario nel mantenimento dell'omeostasi dell'intero sistema cardiocircolatorio. La sua azione si esplica attraverso le diramazioni periferiche del sistema simpatico ed è mediata dalle catecolamine, rilasciate dal surrene in

seguito a svariate situazioni patologiche, eventi in cui l'attivazione di tale sistema risulta di fondamentale importanza per la sopravvivenza stessa del soggetto. Gli effetti delle catecolamine (associate ad altri fattori neuroendocrini), sono rappresentati da un aumento della frequenza e della contrattilità cardiaca e dalla redistribuzione del flusso ematico nei distretti vitali mediante vasocostrizione periferica. In corso di scompenso cardiaco, questi meccanismi neuromorali risultano efficaci soltanto nelle prime fasi: la stimolazione adrenergica cronica in un cuore scompensato ha effetti tutt'altro che positivi. Tutto ciò esita in un disfunzione delle cellule del miocardio e nella loro morte (apoptosi), vasocostrizione periferica, ipertrofia miocardia con fibrosi e possibili aritmie (Martin, 2003). La concentrazione della Noradrenalina (NE) nel sangue arterioso costituisce un indice dell'attività di tale sistema e risulta aumentata anche di due o tre volte nel sangue di pazienti affetti

da insufficienza cardiaca, a riposo (Francis et al., 1984). Questo incremento si associa ad un aumento dei livelli di dopamina e talvolta di adrenalina, che indica un aumentata attività da parte della midollare del surrene. L'entità dell'aumento della concentrazione plasmatica della NE, è direttamente correlata alla gravità della disfunzione ventricolare sinistra. In questi pazienti l'incremento dell'attività adrenergica può indurre tachicardia ventricolare e morte improvvisa, soprattutto in presenza di ischemia miocardica. In questi casi la concentrazione di NE nel tessuto miocardico risulta estremamente diminuita: il meccanismo che potrebbe spiegare tale deplezione non è del tutto chiaro, e potrebbe essere dovuto ad un fenomeno di esaurimento legato alla prolungata attivazione adrenergica.

## SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE

Il SRAA, svolge un ruolo decisamente importante per la regolazione della pressione arteriosa in condizioni fisiologiche e patologiche (De Luna et al., 1994). La renina è un enzima proteolitico prodotto come preprorenina dalle cellule granulose della macula densa dell'apparato iuxtaglomerulare a livello della parete dell'arteriola afferente renale (La Villa et Gentilini, 2004). Dalla preprorenina, per distacco di un frammento peptidico deriva la prorenina, che in seguito a glicosilazione e distacco di un ulteriore frammento polipeptidico dà luogo alla renina. La renina è la forma attiva dell'enzima e come tale si rinviene nel torrente circolatorio. L'attività della renina si esplica a livello dell'angiotensinogeno -glicoproteina prodotta a livello epatico- dove catalizza la scissione del legame leucina-valina, con la produzione di



angiotensina I, (AT I), (La Villa et Gentilini, 2004). L'angiotensina I viene a sua volta convertita mediante l'azione dell'enzima ACE (Enzima Convertente l'Angiotensina) in angiotensina II, molecola biologicamente attiva. L'ACE si può rinvenire in diversi distretti ma soprattutto a livello di endotelio polmonare (Orloff et Berliner, 1973). Il meccanismo di conversione dell'AT I in AT II, tuttavia, può essere mediato anche da altri enzimi quali elastasi, chimasi, catepsina G, attivatore tissutale del plasminogeno, chimostatina ACE-sensibile (Sisson 2004)). Infine ricordiamo che dall'AT II è possibile ottenere l'AT III (mediante l'intervento dell'Aminopeptidasi A<sub>2</sub>), enzima attivo a livello della corticale del surrene (Aguggini et al., 1998). La produzione della Renina si verifica in svariate condizioni, quali la diminuzione della pressione a livello dell'arteriola afferente renale, la diminuzione del sodio nel tubulo contorto distale, l'iponatriemia, l'aumento del tono

simpatico, l'aumento del tasso di catecolamine circolanti e l'iperkaliemia. Al contrario la sua secrezione risulta diminuita nel momento in cui aumentano le concentrazioni plasmatiche di AT II, ANF, Endotelina, EDRF, ed ADH. Inoltre svariati fattori quali istamina, PG, paratormone, glucagone possono influire sul rilascio di renina.

Gli effetti dell'AT II sono maggiormente legati ad una potente azione di vasocostrizione periferica, con amplificazione dell'azione del sistema adrenergico e quindi aumento della captazione di noradrenalina da parte delle terminazioni nervose periferiche.

A livello miocardico tutto ciò si traduce in un'azione cronotropa, inotropa e dromotropa positiva (La Villa e Gentilini, 2004). L'AT II può anche avere un ruolo diretto nel modificare la struttura e la funzione miocardica (Kim et al., 2000): nelle cellule miocardiche in coltura si è visto che l'AT II è in grado di causare ipertrofia con

induzione dei programmi di geni fetali e apoptosi (Sadoshima et al., 1993; Kajstura et al., 1997). Nel comparto renale l'azione dell'AT II si esplica a livello delle arteriole efferenti e delle cellule mesangiali, dove induce vasocostrizione e aumento del riassorbimento tubulare di sodio in aggiunta alla stimolazione della secrezione di aldosterone a livello surrenalico. Il meccanismo di riassorbimento di sodio si realizza mediante l'aumento delle proteine di membrana a ciò preposte, e si verifica anche a livello delle ghiandole salivari, lacrimali e della mucosa del colon (Sisson 2004). Per ragioni di potenziale di membrana, al trasporto di sodio corrisponde il passaggio in senso inverso di ioni  $H^+$  e  $K^+$  escreti nel tubulo contorto distale (Aguggini et al., 1998).

Abbiamo già accennato al fatto che i meccanismi di compenso messi in atto dall'organismo in presenza di una malattia cardiaca cronica sono efficaci solo nelle prime fasi. In questo contesto il SRAA ed il sistema

nervoso simpatico hanno il compito di garantire un'adeguata perfusione dei distretti vitali dell'organismo, quali cervello e rene, ma nel momento in cui la malattia cardiaca cronicizza l'eccessivo aumento delle resistenze periferiche e la ritenzione idricosalina inducono un aumento del lavoro del ventricolo sinistro (pre e postcarico), già emodinamicamente deficitario (Braunwald, 1991). A ciò può aggiungersi una riduzione del flusso coronarico ad opera della vasocostrizione indotta dall'AT II e quindi, l'insorgenza di una possibile condizione ischemico-ipossica-aritmogena del miocardio (Braunwald, 1991). Per spiegare l'insorgenza dell'ischemia, Dei Cas et al (1993) hanno supposto anche che l'aumento del fabbisogno di ossigeno del miocardio ipertrofico, non emodinamicamente supportato, sarebbe la causa di un'insufficienza coronarica relativa.

Ai fini diagnostici e prognostici, l'impiego del dosaggio del SRRA può essere effettuato mediante RIA, per dosare l'attività della Renina Plasmatica (PRA), anche se svariate concause, quali diete iposodiche, disidratazione, perdita di peso, esercizio fisico sostenuto, possono indurre stimolazione dell'apparato juxtaglomerulare per diminuzione del flusso renale (Sisson, 2004).

## ORMONE ANTIDIURETICO

L'ormone antidiuretico (ADH), noto anche come arginina-vasopressina, è un nonapeptide sintetizzato a carico dei neuroni magnocellulari dei nuclei sopraottico (in misura maggiore) e paraventricolare dell'ipotalamo anteriore (Aguggini et al., 1998). Sotto forma di proormone viene trasportato a livello ipofisario, dove viene

immagazzinato come forma attiva. Il rilascio dell'ormone dai granuli ipofisari avviene per stimolazione diretta della ghiandola posteriore.

Fisiologicamente l'ADH regola l'osmolarità plasmatica e del comparto extracellulare, influenzando sulla diuresi.

Giunto in sede renale, l'ormone si lega ai recettori V2 presenti sulla membrana peritubulare delle cellule epiteliali del dotto collettore.

L'effetto finale dell'attivazione di questo meccanismo è un aumento della permeabilità della membrana luminale delle cellule tubulari del dotto all'acqua libera, che viene riassorbita dall'ultrafiltrato glomerulare promuovendo la concentrazione delle urine, accanto ad una ritenzione idrica sistemica da parte dell'organismo. L'ADH svolge un ruolo importante anche nel mantenimento dell'omeostasi cardiocircolatoria, essendo un potente fattore vasoattivo in grado di provocare vasocostrizione sistemica. Il meccanismo si esplica a livello della

muscolatura liscia vasale e consiste nell'interazione con i cosiddetti recettori V1: una volta avvenuto il legame ormone recettore si attivano le fosfolipasi C che mediante una serie di reazioni portano ad un aumento del calcio intracellulare e quindi a vasocostrizione.

Nell'ambito dei meccanismi di controllo neuro ormonali esiste una relazione diretta tra osmolarità e concentrazione plasmatica di ADH ed una di tipo esponenziale intercorre tra pressione arteriosa e ADH.

Questa affermazione significa che fisiologicamente l'influenza dell'ADH sulla volemia e la pressione arteriosa è modesta, poiché le oscillazioni di pressione sono troppo piccole per indurre il rilascio dell'ormone, che risponde per lo più a stimoli di natura osmotica. Al contrario, livelli plasmatici maggiori di quelli osservabili in risposta ad uno stimolo osmotico di grande entità, si riscontrano nelle condizioni in cui la pressione arteriosa e la volemia si riducono a livelli patologici,

come in corso di insufficienza cardiaca congestizia, diarrea, emorragia, etc. Nell'uomo, un elevato tasso di ADH è stato riscontrato in corso di insufficienza cardiaca congestizia nonostante la riduzione dell'osmolarità (Braunwald, 1991).



## **Endocardiosi Mitralica**

La degenerazione cronica della valvola mitrale, conosciuta anche come endocardiosi mitralica è una degenerazione mixomatosa della valvola bicuspidale mitralica, che nel 30% dei casi coinvolge anche la tricuspide.

L'endocardiosi mitralica riveste notevole importanza nella clinica dei piccoli animali, rappresentando la cardiopatia acquisita di più frequente riscontro nella specie canina.

Trattasi di una patologia spontanea frequente negli animali anziani, che insorge in forma del tutto asintomatica, ben compensata, rilevabile solo all'auscultazione cardiaca (soffio apicale).

Sul piano topografico la valvola mitrale è posta nel cuore di sinistra, tra atrio e ventricolo, dove ha il compito di evitare che il sangue refluisca in senso retrogrado verso l'atrio durante la sistole ventricolare. La

chiusura dell'ostio valvolare avviene grazie all'interazione di diverse strutture anatomiche, che costituiscono il cosiddetto **complesso mitralico**. Tali strutture sono rappresentate dall'anulus valvolare, dai due lembi valvolari (settale anteriore e parietale posteriore) dalle corde tendinee, dai muscoli papillari, dalla parete atriale e dal miocardio ventricolare.

In realtà la progressione della malattia degenerativa valvolare è generalmente lenta ed un iter diagnostico precoce e corretto può contribuire a mantenere il cuore in condizioni di compenso.

L'insufficienza mitralica riconosce fattori causali di tipo congenito, come ad esempio la displasia (evento in verità abbastanza raro) o fattori acquisiti. Tra questi ultimi si annoverano le patologie di tipo degenerativo (endocardiosi), di tipo flogistico (endocarditi rare), o

funzionali (dilatazione dell'anulus valvolare per sovraccarico di volume del ventricolo sinistro e nelle cardiopatie dilatative).

Istologicamente i lembi valvolari sono formati da quattro strati:

- Atriale (endotelio-connettivo);
- Spongioso (fibrille di collagene e fibroblasti, immersi in un gel mucopolisaccaridico);
- Fibroso (strato compatto di fibre collagene);
- Ventricolare (endotelio e connettivo) legato alla proliferazione dei fibroblasti dello strato spongioso con deposizione di mucopolisaccaridi, (glicosaminoglicani).

Sono del tutto assenti i processi flogistici, riscontrabili comunemente nell'uomo. Microscopicamente, si possono evidenziare lesioni di diverso grado così schematicamente inquadrabili:

- I grado → presenza di piccoli noduli lungo i lembi valvolari;

- II grado → presenza di numerosi noduli confluenti, che danno luogo ad ispessimento dei lembi;
- III grado → presenza di noduli di grosse dimensioni formanti placche, con coinvolgimento delle corde tendinee;
- IV grado → lembi valvolari deformati, accorciati con aspetto a paracadute; le corde tendinee possono andare incontro a rottura con prolasso dei lembi valvolari nella cavità atriale.

In alcuni casi le lesioni coinvolgono l'endocardio atriale, con possibili fenomeni di lacerazione o fissurazione.

Dai dati disponibili in letteratura, possiamo rilevare che l'endocardiosi nel 10% dei casi si sviluppa soltanto a carico della valvola tricuspide, nel 60% solo a carico della mitrale, mentre nel 30% dei casi sono coinvolte entrambe le valvole (Kittleson e Kienle, 1998).

L'interessamento delle semilunari aortiche e polmonari è da considerarsi molto raro.

La malattia mitralica si riscontra con maggiore frequenza nei cani anziani. In particolare, circa il 35% dei soggetti di età superiore ai 12 anni e circa il 75% di quelli con età superiore ai 16 anni, mostrano segni clinici dovuti a degenerazione mixomatosa della valvola mitrale (Buchanan, 1977).

Statisticamente i maschi sono più colpiti delle femmine. Esistono anche predisposizioni di razza; risultano infatti maggiormente colpiti i cani di razza medio-piccola, come i bassotti, i barboncini, ed in particolare, i Cavalier King Charles Spaniel, in cui la malattia ha un esordio molto precoce. In tale razza il 30-50% dei soggetti può presentare un soffio a partire dai 5 anni di età. E' interessante sottolineare che più dell'80% dei soggetti al di sotto dei 3 anni di età, mostra segni ecocardiografici di

prolasso della mitrale, in assenza di soffio cardiaco clinicamente apprezzabile (Pedersen et al., 1995) Il meccanismo eziopatogenetico della degenerazione mixomatosa della valvola non è stato ancora chiarito a fondo, ma la prevalenza della malattia in razze predisposte ad altre collagenopatie (patologie in cui si verificano alterazioni nella sintesi, nell'organizzazione o nella lisi del collagene), potrebbe suffragare l'ipotesi di una predisposizione ereditaria. E' stata anche prospettata l'ipotesi di una disfunzione autonoma da ipertono vagale, che provocherebbe una ridotta contrazione dell'anulus valvolare, con prolasso dei lembi. Olsen et al.,(1999) hanno messo in correlazione il torace stretto e la presenza di prolasso mitralico nel Bassotto Tedesco. Swenson et al., (1996) hanno invece supposto che sempre nel Cavalier King Charles Spaniel la degenerazione mixomatosa valvolare potrebbe essere ereditata con un meccanismo poligenico.

E' opinione comune che esista una correlazione tra valvulopatia mitralica e malattie infiammatorie settiche del cavo orale, tipiche dei cani anziani, ma attualmente non esiste alcuna evidenza scientifica che supporti tale tesi.

Emodinamicamente il rigurgito mitralico porta alla riduzione della gittata cardiaca, con aumento del gradiente pressorio sia nell'atrio sinistro sia a livello del letto vascolare polmonare, ed incremento del volume telediastolico ventricolare sinistro, cioè del precarico. Il rigurgito è direttamente correlato al diametro dell'ostio valvolare, al gradiente pressorio tra ventricolo ed atrio sinistro ed alla durata della sistole. I meccanismi di compenso messi in atto dall'organismo in questa fase, sono volti al mantenimento di un'adeguata gittata cardiaca, e sono essenzialmente rappresentati dall'aumento della frequenza e della forza di contrazione del miocardio (cronotropismo e inotropismo), dalla



vasocostrizione, con aumento delle resistenze vascolari periferiche, dalla ritenzione idrosalina, mediante attivazione del SRAA/ADH e dall'intervento del sistema Simpatico-Adrenergico.

Nelle fasi iniziali, l'atrio si dilata e va incontro ad ipertrofia eccentrica accogliendo una maggiore quantità di sangue, senza che si verifichino significativi incrementi pressori a carico del circolo polmonare. Il ventricolo sinistro, a causa del maggiore riempimento diastolico, cioè dell'aumento del pre-carico, va incontro anch'esso ad ipertrofia eccentrica con aumento progressivo del diametro telediastolico. L'ipertrofia e l'iperplasia rappresentano il principale meccanismo cronico di compenso nell'insufficienza mitralica: il ventricolo sinistro può arrivare a raddoppiare il proprio diametro telediastolico ed il proprio peso. Con il progredire delle lesioni valvolari e l'aumento del diametro dell'anulus valvolare, aumenta la pressione

intratriale ( $> 20-25$  mm Hg) e quella delle vene polmonari. Ciò comporta congestione del distretto polmonare ed insorgenza di edema interstiziale ed alveolare fino al coinvolgimento del cuore di destra. La progressione di questi fenomeni è generalmente lenta, potendo durare diversi anni.

La situazione emodinamica può scompensarsi improvvisamente ed in seguito alla dilatazione dell'atrio sinistro compaiono i sintomi clinici, primo fra tutti la tosse secca, dovuta a compressione dell'atrio dilatato sul bronco principale sinistro.

Il persistente sovraccarico volumetrico si accompagna a deleterie modificazioni strutturali del miocardio, in gran parte legate all'attivazione cronica dei meccanismi neuro-umoral di compenso; esse sono rappresentate da fenomeni di ischemia subendocardica, dal rimodellamento cardiaco, da processi riparativi sclerotici, il tutto in

associazione a “down regulation” dei recettori B1 e comparsa di aritmie.

Nelle fasi finali della malattia si assiste al depauperamento della riserva contrattile delle fibre miocardiche, con comparsa di insufficienza cardiaca ed aumento del diametro e del volume telesistolico (post-carico). Questa condizione esita in un grave deficit funzionale, per cui si instaurano tutti i segni tipici dell'insufficienza cardiaca fino allo scompenso. Il cuore insufficiente diviene sempre meno influenzabile dagli aumenti del pre-carico e sempre più sensibile agli aumenti del post-carico. Il precoce intervento dei meccanismi neuro-endocrini consente di mantenere una efficace perfusione ematica periferica, per cui i segni della bassa portata compaiono tardivamente.

Dal punto di vista semiologico compare la tosse, inizialmente secca, che rappresenta il sintomo più comune; la tosse diviene poi grassa e può

essere accompagnata da dispnea, da intolleranza allo sforzo e talora dalla sincope.

All'esame clinico diretto, le forme lievi si presentano del tutto asintomatiche, potendo trascorrere anche anni prima della comparsa dei sintomi clinici.

Abbiamo accennato alla comparsa della tosse, quale sintomo precoce più caratteristico, le cui peculiarità possono essere diverse a seconda delle fasi della malattia: essa può essere secca nelle fasi iniziali, o grassa con espettorazione talora rosata nello scompenso sinistro retrogrado grave. La tosse da edema si accentua sotto sforzo ed è tipicamente notturna. Nelle fasi più avanzate la tosse è presente anche a riposo, l'animale dimagrisce, le mucose divengono cianotiche, il respiro frequente e dispnoico, l'auscultazione del torace mette in luce rantoli crepitanti, sibili, mentre il riscontro di versamenti cavitari e di

epatosplenomegalia suggerisce il coinvolgimento del cuore destro, il polso è frequente, piccolo o aritmico.

All'esame clinico dell'apparato cardiocircolatorio, possiamo apprezzare la presenza del turgore delle giugulari (nell'ICC destra), e talora un fremito alla palpazione dell'aia cardica.

L'itto, così come il I tono, sono accentuati nell'ipertrofia cardiaca. Il reperto clinico più caratteristico è il soffio, olosistolico, apicale, di grado variabile (I/VI), che si irradia sul focolaio della tricuspid.

Le possibili complicanze della patologia mitralica avanzata possono essere rappresentate da episodi sincopali o di collasso, dovuti a rottura dell'atrio sinistro, a tamponamento cardiaco o a comparsa di tachiaritmie e da edema polmonare acuto, come conseguenza della rottura delle corde tendinee o di accessi di tosse.

La diagnosi differenziale della patologia mitralica va sempre posta nei confronti della stenosi aortica e polmonare, endocardite batterica, displasia mitralica, forme cardiache dilatative e collasso tracheale.

Ai fini diagnostici, prognostici e terapeutici, oltre alla visita clinica, vanno sempre effettuate tutte le indagini biochimiche collaterali, accanto all'esecuzione dell'esame elettrocardiografico, radiografico del torace, ecocardiografico (bidimensionale real time, M-mode ed eco-Doppler), e la misurazione della pressione arteriosa. L'esame elettrocardiografico non offre, nella maggior parte dei casi elementi salienti, ma può comunque essere utile per l'eventuale rilievo di aritmie sopraventricolari e per la messa in evidenza della cosiddetta "P Mitralica", cioè un'onda con una durata superiore ai 40 millisecondi. Tale rilievo, pur essendo altamente specifico, è un indice di

ingrandimento atriale sinistro osservabile in una percentuale limitata di pazienti.

In effetti, secondo alcuni autori, la P mitralica si renderebbe evidente solo in presenza di un certo grado di fibrosi della parete atriale ed ancora, la presenza di una P mitralica sul tracciato indica una dilatazione atriale sinistra, ma una sua assenza non ne autorizza a priori l'esclusione (Porciello, 2003).

In aggiunta a ciò è possibile rilevare onde R con voltaggio elevato ( $>$  di 2,5/3 mV in II derivazione), quale indice di ingrandimento ventricolare sinistro. Infine, in presenza di ipertensione polmonare, l'onda P può presentare un voltaggio superiore ai 0,4 mV, e viene definita, appunto, come "P Polmonare".

L'esame radiografico risulta di fondamentale importanza in corso malattia mitralica, sia per la possibilità di evidenziare le modificazioni

della silhouette cardiaca, sia per la valutazione accessoria delle strutture toraciche, quali i campi polmonari, i grossi vasi, la trachea, le pleure ed il mediastino, strutture che potrebbero essere coinvolte nell'insorgenza della tosse e dispnea, comuni nelle patologie cardiache ed extracardiache. In particolare, con la proiezione latero-laterale è possibile apprezzare l'ingrandimento del cuore di sinistra con eventuale spostamento dorsale della trachea, compressione del bronco principale di sinistra ad opera dell'atrio dilatato (causa di tosse), e l'arrotondamento del profilo posteriore dell'ombra cardiaca. Osservando invece un radiogramma in proiezione sagittale è possibile evidenziare l'arrotondamento dell'apice cardiaco, la prominente dell'orecchietta di sinistra e la forma del cuore nel suo insieme. Infine l'osservazione del campo polmonare risulta di fondamentale importanza per escludere la presenza di edema o congestione.



Conclude l'iter diagnostico strumentale l'esame ecocardiografico, fondamentale per confermare la diagnosi di insufficienza mitralica, per effettuare una valutazione quantitativa delle modificazioni che si verificano a carico della camere cardiache e per valutare la contrattilità del ventricolo sinistro.

L'esame bidimensionale ci permette di valutare l'ispessimento dei lembi valvolari, delle corde tendinee e la loro dinamicità in rapporto alle strutture circostanti, il rapporto Atrio sinistro/Aorta, i movimenti del setto interventricolare (ipercinesi), ed il grado di ipertrofia del ventricolo sinistro. L'esame M-mode consente, invece, di misurare i diametri ventricolari interni, cioè quello telediastolico, generalmente aumentato e quello telesistolico, parametri che a loro volta forniscono indicazioni sull'attività contrattile del ventricolo (FA). La frazione di accorciamento (FA), in un paziente sano ha un valore di circa il 35%,

mentre in un soggetto con insufficienza mitralica si presenta aumentata e soltanto nelle fasi terminali della patologia si presenta ridotta. Con l'utilizzo della ecocardiografia Doppler (pulsato-continuo) è possibile, infine, valutare la direzione e la velocità dei flussi, ottenendo informazioni precise e dettagliate sull'entità del rigurgito stesso e quindi sulla progressione della malattia.

La terapia in corso di endocardiosi mitralica è articolata in modo da rallentare il più possibile la inevitabile progressione della patologia, migliorando la qualità di vita dell'animale. Sicuramente tra i farmaci più utilizzati nel cane spiccano gli ACE inibitori, dei dilatatori misti che impiegati nelle fasi precoci della malattia possono contribuire a ridurre il pre- e post-carico ed i fenomeni di rimodellamento cardiaco. Tra le molecole più utilizzate ricordiamo l'Enalapril (0.25 mg/Kg BID), il Benazepril (0.25 mg/Kg SID) ed il Ramipril (0.125 mg/Kg SID).

Il trattamento terapeutico andrebbe iniziato quando il rapporto Atrio sinistro/Aorta, rilevabile ecocardiograficamente, risulta maggiore di 1,4; inoltre bisogna monitorare la funzionalità renale, potendo queste molecole provocare innalzamento dell'urea ematica. Un'altra categoria di farmaci comunemente impiegati nella gestione della malattia cardiaca è rappresentata dai diuretici, quali la furosemide, un diuretico d'ansa largamente impiegato per la sua rapidità d'azione e la sua maneggevolezza (1 mg/Kg a gg alterni, 1-4 mg/kg TID nell'EPA) e dai diuretici risparmiatori di potassio (0.5 -1 mg/kg SID), da associare alla furosemide in pazienti ISACHC–III.

Se sono presenti deficit contrattili si possono impiegare gli inotropi positivi, quali la Digossina (0.005-0.01 mg/Kg BID), particolarmente indicata quando la FA è inferiore al 20 % (ISACHC II - III) e il Pimobendano (0.25 mg/Kg BID) un inibitore delle fosfodiesterasi

(vasodilatatore oltre che inotropo positivo nei pazienti di II/III classe ISACHC).

Tra le prospettive terapeutiche future si può annoverare l'utilizzo anche in campo veterinario del Carvedilolo, Beta1-bloccante e vasodilatatore che ha dimostrato di prolungare la sopravvivenza di pazienti umani con ICC in IV classe NYHA. E' noto, infatti, che la stimolazione adrenergica cronica comporta down-regulation dei beta1-recettori e che il tasso di noradrenalina nel sangue è inversamente proporzionale al tempo di sopravvivenza del paziente cardiopatico cronico. Nello studio Copernicus (2000) su 2289 soggetti arruolati, la mortalità è stata del 18.5 % nel gruppo placebo e del 11.4 nel gruppo trattato con carvedilolo, con una riduzione della mortalità pari al 35 %. Nel cane, il farmaco risulta ancora poco sperimentato, ma nel doberman con CMD occulta il carvedilolo, può ritardare la comparsa dei sintomi (Gordon,

2006), mentre nel Cavalier King con E.M. classe 1 riduce il diametro atriale e ventricolare sinistro ed, inoltre, migliora la funzionalità del ventricolo.

## **I Peptidi Natriuretici**

I peptidi natriuretici (PN) cardiaci, ANP e BNP, sono sostanze di natura ormonale caratterizzate da una struttura peptidica simile, che si lega allo specifico recettore cellulare esprimendo il meccanismo d'azione e da una catena aminoacidica terminale, variabile a seconda della singola molecola (Vittorini et al., 2006). Nei tessuti animali, si possono isolare l'ANP (Atrial Natriuretic Peptide), il BNP (Brain Natriuretic Peptide), il CNP (C-type Natriuretic Peptide), il DNP (D-type o Dendroaspis Natriuretic Peptide), e l'Urodilatina (Fortunato, 2005). Il BNP fu isolato per la prima volta nel 1998 dall'estratto acido di cervello di suino ad opera di Sudoh.

Il Natriuretico *C-type* si ritrova in soggetti sani in concentrazioni minimali, per cui si suppone abbia un ruolo di natura paracrina, deputato al rilassamento della muscolatura vasale e all'inibizione del rimodellamento vascolare (Sisson, 2004). L'ANP ed il BNP, il cui ruolo risulta determinante nell'omeostasi cardiocircolatoria, sono secreti prevalentemente a livello cardiaco, dove si trovano espressi maggiormente i geni NPPA e NPPB che codificano per i due ormoni. In realtà questi geni codificano per i precursori di ANP e BNP, denominati prepro-ormoni (pre-pro-ANF e pre-pro-BNF), conservati nella membrana miocardica atriale (Sisson, 2004) e convertiti in pro-ormoni durante la sintesi proteica.

Successivamente, le due molecole in seguito al "clivage" del frammento C-terminale, vengono immesse nel torrente circolatorio con le sigle NT-proANP e NT-proBNP.



La struttura dei due peptidi è praticamente identica: entrambi sono composti di una catena di 17 aminoacidi chiusa “ad anello” da un ponte disolfuro tra due residui di cisteina, ad eccezione della sequenza degli aminoacidi stessi, in quanto sono molecole sintetizzate a partire da geni differenti (Sisson, 2004).

L’ANP è secreto principalmente dai cardiomiociti atriali, mentre il BNP da quelli ventricolari, soprattutto in corso di scompenso cardiaco cronico.

In realtà, studi recenti condotti in campo umano hanno dimostrato che anche i fibroblasti possono promuovere a livello cardiaco la produzione di ormoni natriuretici. Attualmente il significato preciso di questo meccanismo non appare del tutto chiaro, dal momento che tutti i tessuti esprimono geni per l’ ANP ed il BNP.

Dal punto di vista patogenetico, lo stiramento della parete atriale è il più importante stimolo per la sintesi e la secrezione dell'ANP.

I cardiomiociti atriali immagazzinano il pro-ormone (pro-ANP), sotto forma di granuli e lo convertono nella parte attiva prima della secrezione.

In condizioni fisiologiche appare certo che la maggior parte delle molecole di ANP e BNP circolanti derivi dall'atrio, questo perché il rapporto molare tra le due molecole è pari a 0.5 (2 molecole di ANP e 1 di BNP). In condizioni di stress cronico, invece, la concentrazione di BNP aumenta maggiormente rispetto al valore dell'ANP circolante, poiché la massa ventricolare è più grande di quella atriale e quindi la secrezione del BNP supera quella dell'ANP.

Come già detto lo stiramento della parete atriale è il più importante stimolo per la secrezione degli ormoni natriuretici, per cui ogni

condizione, anche fisiologica, associata ad un incremento acuto del ritorno venoso può causare un aumento dei valori plasmatici di ANP e BNP.

Il meccanismo d'azione dei PN è rappresentato da un'azione diuretica, natriuretica e vasodilatatrice, accompagnata da un'azione inibitoria sulla capacità contrattile dei cardiomiociti, sul rimodellamento cardiaco e sui processi infiammatori del tessuto miocardico.

Essi hanno quindi un'azione protettiva sul sistema cardiaco, non solo come ormoni circolanti, ma anche come fattori locali antifibrotici ed antipertrofici.

Tale meccanismo, assume un'importanza fondamentale se si considera che la fibrosi è una causa essenziale di rimodellamento cardiaco in corso di scompenso cronico e che esiste una correlazione tra il livello di PN circolanti e il grado stesso di rimodellamento. Un ulteriore

conferma di tale correlazione è rappresentata dal fatto che entrambi i meccanismi descritti, cioè fibrosi e rilascio dei PN, sono favoriti dallo stiramento delle fibre miocardiche.

Inoltre, i PN interagiscono con il sistema neuro ormonale, quello neuro-endocrino ed il sistema immunitario.

Tutte queste osservazioni mostrano come la secrezione dei due peptidi non sia limitata solo al comparto cardiaco, ma si può riscontrare anche in corso di malattie primitivamente non cardiache, quali ad esempio malattie respiratorie acute e croniche, malattie renali, cirrosi epatica, shock settico, malattie infiammatorie, sindromi paraneoplastiche etc.

Inoltre, qualsiasi “danno” o insulto a livello cellulare che comporti il rilascio di costituenti sarcoplasmatici, come ad esempio sostanze tossiche, traumi chirurgici, necrosi ischemica, provoca un incremento

dei livelli plasmatici di PN circolanti, proporzionale all'area di tessuto miocardico danneggiato.

Il meccanismo d'azione delle due molecole avviene attraverso l'interazione con specifici recettori di membrana (NPR): attualmente recettori delle cellule bersaglio, NPR-A, NPR-B e NPR-C (i cui effetti non sono del tutto chiari), sono stati individuati a livello renale, arteriolare, surrenalico e nel Sistema Nervoso Centrale. Da questa interazione scaturiscono gli effetti riconoscibili in riduzione del riassorbimento del sodio, vasodilatazione, inibizione della renina e dell'aldosterone (Espiner, 1994; Espiner et al., 1995).

I recettori NPR-C mediano la degradazione dei PN con un meccanismo di internalizzazione, che li rende disponibili per la processazione grazie all'intervento dei lisosomi e di un'endopeptidasi neutra, un enzima di

membrana che riduce i PN in frammenti peptidici (Espiner, 1994; Espiner et al., 1995).

Questa endopeptidasi, pare essere maggiormente attiva nei confronti dell'ANF piuttosto che del BNP, fenomeno, questo, che potrebbe spiegare la maggior emivita di quest'ultimo (Espiner, 1994; Yandle, 1994; Espiner et al., 1995).

Secondo alcuni autori (Hunt et al., 1995; Cowie et al., 1997) i PN N-terminali possono essere considerati marker di disfunzione cardiovascolare molto più sensibili rispetto ai PN C-terminali, essendo i livelli plasmatici di questi ultimi molto più corrispondenti alla gravità del processo patologico in atto. La spiegazione di ciò risiede nel fatto che i PN C-terminali sono di gran lunga più sensibili rispetto ai medesimi N-terminali per quanto concerne la clearance dell'escrezione renale. Recenti acquisizioni in medicina umana, hanno inoltre

confermato la presenza dei geni NPPA e NPPB nel sistema nervoso centrale, dove agiscono come neuro-trasmettitori o modulatori.

Nel plasma di pazienti umani con insufficienza cardiaca, i livelli dei due peptidi risultano elevati. A livello cardiaco, in un soggetto sano, l'ANP è prevalente negli atri, dove al contrario risultano poco espressi BNP e CNP. Nei soggetti affetti da insufficienza cardiaca, il contenuto di ANP a livello atriale resta più o meno invariato, mentre la concentrazione di BNP e CNP aumenta rispettivamente di 10 e di 2-3 volte (Talwar et al., 2000).

In campo veterinario, inoltre, si è cercato di capire se la valutazione della concentrazione di BNP potesse essere un utile marker per discriminare l'insufficienza cardiaca congestizia da una malattia polmonare primaria. Recenti studi effettuati in tale campo hanno dimostrato come l'andamento del peptide è sensibilmente diverso nelle

due situazioni, essendo fortemente aumentato nei soggetti con insufficienza cardiaca rispetto a quelli con malattia respiratoria primaria (Deborah et al., 2008; Boswood et al ., 2008).

Il dosaggio di ANF e BNF è attualmente effettuato, in Medicina Veterinaria, mediante metodica RIA (Haggstrom et al., 1994; Biondo et al., 2002; Sisson, 2004).

Per il dosaggio dell'ANF, possono essere impiegati kit umani, in quanto tale peptide mostra rilevanti analogie strutturali tra uomo cane e gatto; in più, gli anticorpi impiegati per la reazione sono diretti contro i residui aminoacidici che vanno dall'80 al 96 dell'ANF umano, gli stessi presenti nella medesima regione dell'NT-proANF canino e felino (Biondo et al., 2002; Haggstrom et al., 1994).

A differenza di quanto considerato precedentemente per il BNF non possono essere impiegati kit umani, in quanto esistono importanti, e



sostanziali differenze tra le sequenze aminoacidiche del peptide umano e quello canino e felino (Liu et al., 2002). Nell'ambito della diagnostica veterinaria, inoltre, una ulteriore distinzione va operata in merito al BNF canino e felino: sebbene abbiano rilevante analogia di composizione e strutturale, in uno studio Sisson esprimeva la necessità di impiegare kit specie-specifici per potenziare la sensibilità e la specificità degli stessi (Sisson, 2004). Infine, il valore diagnostico del dosaggio del BNF nel cane non sembra essere di gran vantaggio, in quanto significativi aumenti della concentrazione dello stesso si osservano soltanto in stadi avanzati dello scompenso cardiaco (III e IV classe NYHA, in cani con degenerazione delle valvole atrioventricolari): tali concentrazioni, si è visto, risultano essere di gran lunga inferiori ai medesimi stadi della malattia sia nel gatto che nell'uomo (Haggstrom et al., 2000; MacDonald et al., 2003).

**Fattori vasoattivi di origine endoteliale:**

**Endotelina 1 (ET1)**

Fisiologicamente il tono vascolare è regolato da fattori di diversa natura, alcuni di tipo paracrino ed altri con attività che si estrinseca anche a livello di siti distanti da quello di produzione ed è ormai riconosciuto, in questo contesto, il ruolo primario dell'endotelio nei meccanismi che portano alla vasocostrizione (Fontana et al., 1993).

Studi condotti in proposito hanno evidenziato che la sostanza rilasciata dalle cellule endoteliali, che si identifica nel nitrossido NO, (incluso nell'elenco delle sostanze ad attività rilasciante EDRF), è un potente miorilassante che agisce a livello delle cellule muscolari lisce ed il suo rilascio è influenzato dall'attivazione di numerosi fattori quali, ad esempio, trombina, serotonina, ADP e ATP, liberati durante i meccanismi di aggregazione piastrinica ed i fenomeni trombotici, o

fattori neuro ormonali, quali noradrenalina, vasopressina, istamina, acetilcolina ed, ancora, in seguito a stiramento della parete atriale.

Nel 1985 (Hickey), emerse il ruolo centrale dell'endotelina nei meccanismi di vasocostrizione, con la scoperta che il sovrnatante di colture cellulari endoteliali aortiche di maiale è in grado di provocare prolungata vasocostrizione sulle coronarie isolate di coniglio.

Successivamente, nel 1988 Yanagisawa et al., isolarono, sempre a partire dalle medesime colture cellulari, un peptide costituito da 21 aminoacidi dotato di una potente azione vasocostrittrice, addirittura maggiore dell'angiotensina II: tale fattore fu denominato endotelina.

Il termine endotelina, in realtà, si riferisce ad una famiglia di peptidi composta da almeno quattro distinti fattori, ognuno codificato da un diverso gene: l'ET-1, quella suina ed umana, l'ET-2, l'ET-3, l'originale

del ratto, e la  $\beta$  endotelina, con azione vasocostrittrice che si esplica soprattutto a livello intestinale (Inoue et al., 1989).

Le endoteline vengono anche definite fattori vasoattivi di derivazione endoteliale ad attività contrattile, EDCF, (Endothelium Derived Contracting Factors). Nell'ambito delle tre isoforme, ET-1, ET-2 ed ET-3, l'endotelina 1 (ET-1), viene prodotta dalle cellule endoteliali come precursore, detto Preproendotelina, formata da una sequenza di 203 aminoacidi, successivamente convertita in Proendotelina o big ET, un peptide di 38 aminoacidi, grazie all'azione di enzimi proteolitici. Infine, ad opera di una proteasi specifica, denominata ECE, enzima di conversione dell'ET, si ottiene la scissione del residuo N-terminale tra l'ET, biologicamente attiva, ed i suoi residui aminoacidici (La Villa e Gentilini, 2004; Sisson, 2004).

La sequenza aminoacidica dell'ET-1 è stata riconosciuta praticamente identica nell'ambito delle specie umana e canina, dove coesistono due legami a ponte tra quattro residui cisteinici, conferendo alla molecola una doppia struttura ad anello (Sisson, 2004).

L'ET-1 felina, invece, differisce dalle precedenti per la presenza dell'aminoacido leucina in posizione 7, sito occupato dalla metionina (Sisson, 2004).

Probabilmente l'ET è immagazzinata in granuli secretori, riscontrati a livello ipofisario, mentre la sua secrezione non è limitata all'endotelio, potendo avvenire anche nelle cellule epiteliali, gliali e mesangiali.

In condizioni fisiologiche, la concentrazione ematica di ET-1 è piuttosto scarsa, e comunque inferiore a quella in grado di esercitare l'azione vasocostrittrice (Yanagisawa et al., 1988), facendo intuire un proprio

ruolo non particolarmente importante come ormone vasoregolatore circolante.

Recettori ad alta specificità per l'ET sono stati trovati sull'avventizia e sulla media dei vasi coronarici, sull'avventizia di arterie e vene dei piccoli vasi e sui tronchi nervosi. Un'altra zona densamente ricca di recettori per l'ET è stata identificata a livello renale, sia nella zona glomerulare della corteccia, sia nella parte più interna della midollare e a livello dei "vasa recta". Ancora, recettori per l'ET sono stati ritrovati a livello cerebrale nella zona dell'ippocampo, nei plessi corioidei e nel cervelletto.

In campo umano è stato visto che l'aumento plasmatico del tasso di ET si verifica in corso di gravi eventi cardiocircolatori, quali shock cardiogeno, infarto acuto del miocardio, interventi chirurgici importanti e trapianto di fegato (Clavell et al., 1993). Il meccanismo che porta

all'aumento del tasso di ET in corso di insufficienza cardiaca congestizia, potrebbe essere conseguente al diffuso danno endoteliale da ischemia per riduzione della portata circolatoria (Fontana et al., 1993). E' interessante notare come, nei pazienti umani con infarto acuto del miocardio, la concentrazione plasmatica dell'ET è massima nelle prime fasi dell'infarto per decrescere gradatamente nelle ore successive (Fontana et al., 1993). La spiegazione di ciò potrebbe essere legata all'attivazione della cascata della coagulazione e all'attivazione piastrinica, entrambi fattori in grado di stimolare il rilascio dell'ET. Un altro meccanismo riscontrabile in corso di infarto acuto, inoltre, può essere la presenza di elevati valori di catecolamine circolanti, anch'esse in grado di stimolare il rilascio del peptide.

Non da ultimo, potrebbe essere preso in considerazione anche lo "stress fisico" indotto dall'infarto stesso (meccanismo che spiegherebbe anche



la presenza di elevati livelli plasmatici di ET riscontrabili in corso di interventi chirurgici addominali). Nel caso in cui l'infarto miocardico acuto sia complicato, il comportamento dell'ET è diverso rispetto al caso precedente, poiché i suoi valori permangono elevati anche per diversi giorni. In tale condizione il meccanismo di incremento dell'ET è multifattoriale, potendo dipendere dal protrarsi dell'ischemia, dall'estensione della necrosi, dall'ipoperfusione sistemica, e dalla ridotta metabolizzazione a livello polmonare (Fontana et al., 1993).

Sempre in campo umano, un incremento dei livelli plasmatici di ET-1, sembra essere direttamente correlato con la gravità dello scompenso (Wei et al., 1994) ed inoltre, la persistenza di elevati livelli plasmatici di ET-1 sembra essere inversamente correlata con i tempi di sopravvivenza del paziente (Rubens et al., 2001). Molteplici stimoli quali l'ipossia, il rilascio di AT II, vasopressina, norepinefrina,

bradichinina, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , interleuchina-1, endotossine, trombina, incrementano la sintesi di ET (La Villa e Gentilini, 2004; Sisson, 2004).

Da studi effettuati nell'uomo (Miyauchi et al., 1999; Rubens et al., 2001), è stato visto come la concentrazione plasmatica di ET-1 risulta aumentata in corso di patologie quali ipertensione polmonare, insufficienza renale ed ischemia cerebrale, ma non in corso di ipertensione sistemica, in cui i dati ottenuti appaiono alquanto discordanti. I livelli plasmatici di ET nei pazienti umani ipertesi sembrano essere sovrapponibili a quelli riscontrati nei pazienti normotesi (Davenport et al., 1990); allo stesso modo eventuali valori elevati di ET riscontrabili nei pazienti medesimi, non sono comunque correlabili ai valori della pressione arteriosa.

Infatti, dal momento che i valori di ET risultano più elevati negli ipertesi con malattia più avanzata rispetto ai pazienti meglio

compensati, sembrerebbe che l'incremento del peptide è legato più alle complicazioni vascolari che alla stessa ipertensione.

Il meccanismo d'azione dell'ET-1 prevede l'interazione con i recettori specifici,  $ET_A$ ,  $ET_B$  ed  $ET_C$ , distribuiti in vari distretti dell'organismo. I recettori  $ET_A$ , maggiormente espressi a livello di muscolatura liscia vasale, hanno elevata affinità per l'ET-1 e l'ET-2, ma non per l'ET-3, i recettori  $ET_B$ , localizzati a livello delle cellule endoteliali, mostrano invece un'eguale affinità per le tre isoforme, mentre i recettori  $ET_C$ , distribuiti a livello del sistema nervoso, hanno un'affinità elevata per l'ET-3.

La stimolazione dei recettori  $ET_A$  comporta effetti quali vasocostrizione, aumento dell'inotropismo miocardico e della concentrazione ematica dell'aldosterone; la stimolazione cronica dei recettori  $ET_A$  è responsabile di ipertrofia a carico della muscolare vasale

e miocardica. L'ET-1 svolge, inoltre, un ruolo tutt'altro che secondario nella progressione del rimodellamento miocardico e della muscolare dei vasi in corso di insufficienza cardiaca ed ipertensione cronica (Sisson, 2004).

Al contrario, la stimolazione dei recettori ET<sub>B</sub>, secondaria all'aumento della produzione di NO ed aldosterone, esita in vasodilatazione e, nel contempo, l'aumento dei livelli di NO inibisce la produzione di ET-1, mostrando un chiaro meccanismo di *feed-back* negativo (Sisson, 2004).

L'impiego di un test ELISA sandwich utilizzato in campo umano per il dosaggio dell'ET1, si è mostrato valido anche in campo diagnostico veterinario. La spiegazione di ciò risiede nel fatto che gli anticorpi impiegati sono diretti contro gli aminoacidi in posizione che va da 8 a 21, siti analoghi per l'uomo, per il cane ed il gatto.

In conclusione possiamo affermare che, nonostante le conoscenze sull'ET1 stiano ormai consentendo di comprendere le azioni biologiche che il peptide esplica a livello vasale, resta ancora da determinare se essa abbia un ruolo puramente fisiologico, oppure il suo incremento diventi significativo in condizioni patologiche, e quindi la possibilità di utilizzare tale molecola come marker diagnostico e prognostico.

## **Citochine Proinfiammatorie**

Le citochine proinfiammatorie, il Tumor Necrosis Factor alfa e l'Interleuchina beta svolgono un ruolo importante nella patogenesi dell'insufficienza miocardica (Sharma et al., 2000). Da osservazioni effettuate in vitro si è visto che queste citochine possono influenzare la crescita e l'espressione genica nelle cellule miocardiche e che livelli circolanti di tali molecole risultano elevati in corso di insufficienza cardiaca.

Il TNF alfa provoca un'immediata disfunzione miocardica, ed in vitro può attenuare i flussi intracellulari degli ioni calcio (Mann et al., 1994; Feldman et al., 2000). Nelle colture cellulari di cellule miocardiche il TNF alfa e l'IL beta possono stimolare l'ipertrofia e la riespressione genica di geni fetali potendo, inoltre, indurre l'apoptosi, mediata

anche dal NO. In studi sperimentali effettuati su ratti in cui è stata praticata l'infusione cronica di TNF alfa si è avuta insufficienza ventricolare sinistra (Bozkurt et al., 1998) ed i topi che superesprimevano il TNF alfa hanno sviluppato una miocardiopatia dilatativa con aumento del fenomeno dell'apoptosi cellulare.



## **PARTE SPERIMENTALE**

## **Materiali e Metodi**

I livelli plasmatici di pro-ANP, Nt-proBNP ed ET-1 sono stati valutati in 29 animali affetti da malattia degenerativa cronica della valvola mitrale (endocardiosi), di età variabile tra gli 8 ed i 14 anni, suddivisi in 18 maschi e 11 femmine, con peso medio di 10 kg. Tutti gli animali arruolati nel presente studio sono stati condotti a visita presso il Servizio di Cardiologia della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Napoli "Federico II". La diagnosi di endocardiosi mitralica è stata formulata sulla base dei rilievi clinico-anamnestici, dei reperti di laboratorio, elettrocardiografici, radiologici ed ecocardiografici. In base alla classificazione funzionale ISACHC (International Small Animal Cardiac Health Council), i 29 animali in esame sono stati suddivisi in quattro gruppi: nel primo gruppo sono stati

inseriti 9 soggetti appartenenti alla classe funzionale Ib, cioè animali asintomatici e ben compensati dal punto di vista emodinamico; nel secondo gruppo sono stati reclutati 9 soggetti appartenenti alla classe funzionale II, ovvero animali con sintomatologia clinica da lieve a moderata e con sintomi evidenti solo dopo sforzo; nel terzo gruppo sono stati inclusi 5 soggetti appartenenti alla classe funzionale IIIa, con sintomatologia clinica evidente anche a riposo e che venivano sottoposti a terapia farmacologica da parte del proprietario; nell'ultimo gruppo, il quarto, sono stati inseriti 6 soggetti appartenenti alla classe IIIb, pazienti le cui condizioni cliniche erano talmente critiche da richiedere il ricovero ospedaliero. Tutti i soggetti reclutati sono stati sottoposti ad accurata indagine anamnestica con segnalamento (*Tabella 1*). In seguito si è proceduto ad effettuare l'Esame Obiettivo Generale completo per valutare alcuni parametri fondamentali al fine di stabilire le condizioni

del circolo periferico, quali lo stato delle mucose ed il tempo di riempimento capillare. Altri importanti rilievi erano rappresentati dalla valutazione dello stato di nutrizione e di idratazione cutanea. All'Esame Obiettivo Particolare l'auscultazione toracica consentiva di valutare l'entità del soffio mitralico e di classificarlo in base al grado (I-VI). Inoltre, ciascun paziente è stato sottoposto all'esecuzione di un tracciato elettrocardiografico, al fine di evidenziare ingrandimenti delle camere cardiache e/o eventuali turbe del ritmo, di due radiogrammi del torace (proiezione latero-laterale e dorso-ventrale), nonché di indagini di laboratorio di routine. Le indagini di laboratorio comprendevano un esame emocromocitometrico completo con formula, nonché la determinazione sierica di azoto ureico, creatinina, GOT, GPT, glicemia, sodio e potassio. Di fondamentale importanza è stato, infine, l'esame ecocardiografico, che ha consentito di studiare le modificazioni

morfometriche delle camere cardiache relative al sovraccarico volumetrico e la funzione sistolica. In particolare sono stati valutati i seguenti parametri monodimensionali e doppler: rapporto atrio sinistro/aorta (LA/AO), diametro telediastolico del ventricolo sinistro, diametro telesistolico del ventricolo sinistro, volume telediastolico del ventricolo sinistro, volume telesistolico del ventricolo sinistro, frazione di accorciamento, frazione di eiezione, indice sistolico, velocità dell'onda E e dell'onda A del pattern di flusso transmitralico, rapporto E/A del pattern di flusso transmitralico, distanza del punto E del mitrogramma dal setto (EPSS) e velocità del rigurgito mitralico.

Inoltre, poiché le concentrazioni plasmatiche dei peptidi natriuretici sono influenzate dalla funzionalità renale, gli animali cardiopatici con valori di BUN maggiori di 70 mg/dl sono stati esclusi dallo studio.

Infine, nessuno dei soggetti arruolati era stato sottoposto a trattamento terapeutico specifico.

Le determinazioni analitiche dei Peptici Natriuretici sono state eseguite su sangue venoso prelevato dalla vena giugulare e raccolto in provette contenenti sodio citrato al 3,8%. Il campione è stato successivamente sottoposto a centrifugazione refrigerata alla temperatura di 4°C per 10 minuti a 2500 rpm. Il plasma ottenuto è stato successivamente aliquotato e stoccato alla temperatura di – 20°C.

Il dosaggio del proANP e del Nt-proBNP è stato eseguito con metodo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) competitivo, impiegando kit commerciali specifici per il cane (Vetsign Canine CardioSCREEN, Guildhay - UK) .

Il kit ELISA utilizzato per la determinazione del proANP si basa sulla tecnica a “sandwich” con anticorpi monoclonali specifici. I campioni da

saggiare sono stati eseguiti sempre in doppio al pari dei punti della curva di taratura. In ciascun pozzetto della piastra sono stati aggiunti 200µl di plasma del campione. Successivamente la piastra è stata incubata per 24 ore a temperatura ambiente, e successivamente sono stati eseguiti quattro lavaggi con “wash buffer”. Quindi, sono stati aggiunti 200µl di “detection antibody”, a cui ha fatto seguito un’incubazione di un’ora a temperatura ambiente. Dopo un ulteriore ciclo di lavaggio, a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 200µl di substrato. L’ultimo step prevedeva trenta minuti di incubazione a temperatura ambiente e l’aggiunta della soluzione di bloccaggio. Le piastre sono state lette ad una lunghezza d’onda di 450nm, e l’elaborazione dei dati è stata ottenuta con un software specifico.



Per quanto riguarda la determinazione del proBNP, la procedura era del tutto simile a quella precedentemente descritta. La lettura della piastra è stata eseguita ad una lunghezza d'onda di 405nm.

Per la determinazione dell'ET-1 è stato utilizzato un kit commerciale designato per la specie umana (Biomedica, Austria), precedentemente validato nel cane (Prosek et al., 2004). Anche in questo caso si trattava di una tecnica “sandwich” immunoenzimatica. I campioni da analizzare sono stati eseguiti in doppio al pari dei punti della curva di taratura. In ciascun pozzetto della piastra sono stati aggiunti 200µl di plasma del campione e 200µl di anticorpo (anticorpi monoclonali anti-endotelina). La piastra è stata, quindi, incubata per 24 ore a temperatura ambiente, e dopo cinque lavaggi con wash buffer, sono stati aggiunti 200µl di “detection antibody” (anti mouse IgG antibody-HRPO), a cui ha fatto seguito un'incubazione di un'ora a temperatura ambiente. Dopo un

ulteriore ciclo di cinque lavaggi, a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 200µl di substrato e dopo trenta minuti di incubazione a temperatura ambiente è stata aggiunta la soluzione di bloccaggio. Le piastre sono state lette ad una lunghezza d'onda di 450 nm, e l'elaborazione dei dati è stata effettuata con un software specifico.

I dati sono stati confrontati con un gruppo di controllo costituito da dieci soggetti clinicamente sani.

L'elaborazione statistica dei parametri rilevati è stata effettuata mediante test  $t$  a due code, mentre con l'intento di valutare una possibile correlazione tra i principali parametri ecocardiografici e la concentrazione plasmatica dei peptidi è stata svolta l'analisi della regressione lineare.

E' stata considerata una soglia di significatività per i valori di  $p \leq 0.05$  e  $p \leq 0.01$ .

RAZZA	SESSO	ETA'	PESO	SUP m <sup>2</sup>
YORK SHIRE	M	10	6	0,33
METICCIO	F	13	14	0.58
DALMATA	M	11	25	0.85
BRETON	M	8	12	0.52
METICCIO	M	13	8	0.40
VOLPINO	M	10	4	0.25
METICCIO	M	9	11	0.49
METICCIO	M	8	8	0.40
COKER	F	8	14	0.58
YORK SHIRE	F	9	5	0.29
BARBONCINO	M	11	8	0.40
METICCIO	M	14	10	0.46
METICCIO	M	11	6	0.33
PECHINESE	M	10	10	0.46
METICCIO	F	10	12	0.52
METICCIO	F	12	7	0.36
YORK SHIRE	F	13	6	0.33
MALTESE	M	9	5	0.29
PASTORE TEDESCO	M	9	35	1.07
PASTORE BELGA	F	10	32	1.01
METICCIO	M	10	25	0.85
PINSCHER	M	10	4	0.25
MASTINO	F	8	40	1.17
BOXER	M	14	20	0.74
METICCIO	F	12	15	0.60
SETTER IRLANDESE	F	8	14	0.58
METICCIO	M	9	27	0.90
ROTTWEILER	M	9	35	1.07
METICCIO	F	8	10	0.46

Tabella 1. Segnalamento degli animali cardiopatici

## **Risultati**

I risultati ottenuti, espressi come media  $\pm$  deviazione standard, sono riportati in Tabella 2.

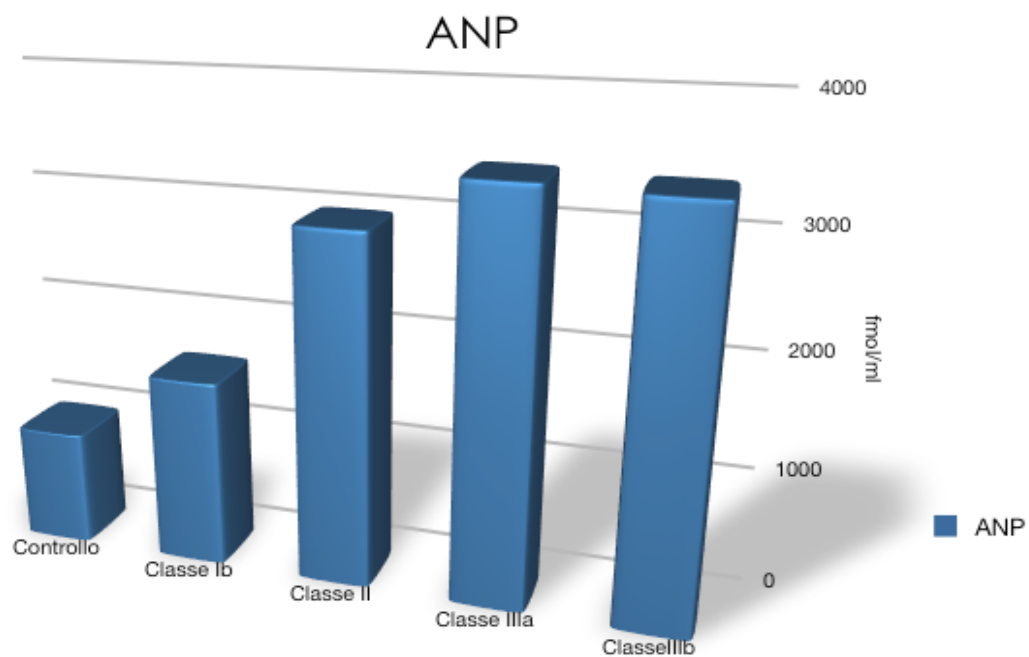
	<b>Classe Ib (n = 9)</b>	<b>Classe II (n = 9)</b>	<b>Classe IIIa (n = 6)</b>	<b>Classe IIIb (n = 5)</b>
<b>ANP (fmol/ml)</b>	<b>1610.0<math>\pm</math>244.3Aa</b>	<b>2975.8<math>\pm</math>844.8b</b>	<b>3412.9<math>\pm</math>506.2B</b>	<b>3381.2<math>\pm</math>1217.3b</b>
<b>BNP (pmol/L)</b>	<b>298.77<math>\pm</math>99.8Ac</b>	<b>700.0<math>\pm</math>222.7°</b>	<b>1711.5<math>\pm</math>804.5bB</b>	<b>2199.0<math>\pm</math>841.2bB</b>
<b>ET-1 (fmol/ml)</b>	<b>2.93<math>\pm</math>1.1</b>	<b>2.29<math>\pm</math>1.1</b>	<b>3.87<math>\pm</math>1.4</b>	<b>4.20<math>\pm</math>2.2</b>

**Tabella 2.** Lettere minuscole (a,b,c) e maiuscole (A,B) differenti sulla stessa riga indicano significatività per  $p < 0.05$  e per  $p < 0.01$ , rispettivamente.

I livelli plasmatici medi di ANP, espressi come media  $\pm$  deviazione standard, hanno mostrato un progressivo aumento con l'avanzare della classe funzionale di scompenso cardiaco, pur non presentando una

differenza statisticamente significativa tra la classe III e la classe II (IIIb

vs I:  $p \leq 0.05$ ; IIIa vs I:  $p \leq 0.01$ ; II vs I  $p: \leq 0.05$ ) (Grafico 1)



	Controllo	Classe Ib	Classe II	Classe IIIa	Classe IIIb
ANP	1110	1610	2975,8	3412,9	3381,2
DS	260	244,3	844,8	506,2	1217,3

*Grafico 1*

Analogo andamento hanno mostrato le concentrazioni medie di BNP, rilevando però per tale peptide variazioni statisticamente significative tra tutte le classi considerate (IIIb vs II:  $p \leq 0.05$ ; IIIa vs II:  $p \leq 0.05$ ; IIIb vs I:  $p \leq 0.01$ ; IIIa vs I:  $p \leq 0.01$ ; II vs I  $p \leq 0.05$ ) (Grafico 2).

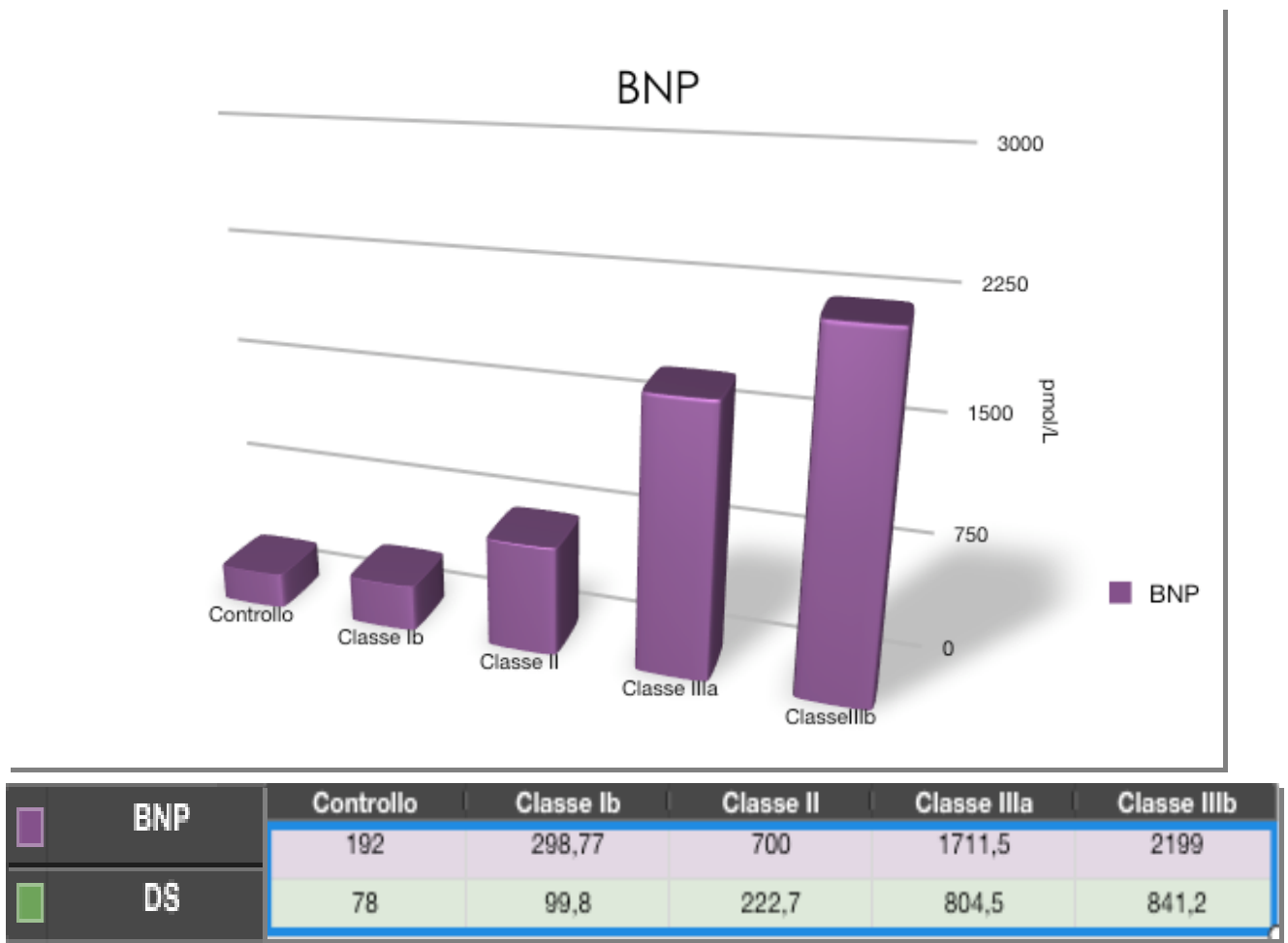
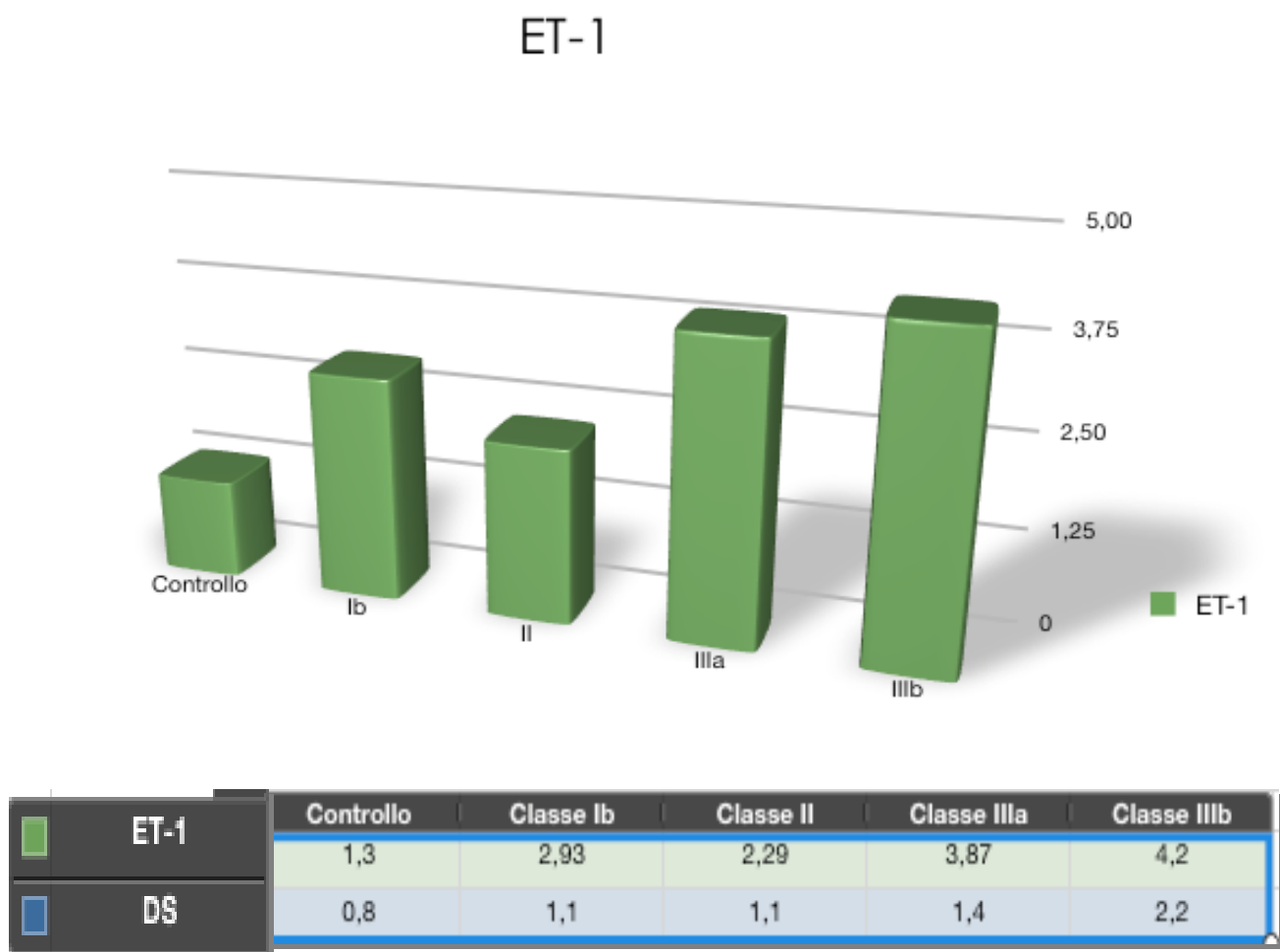


Grafico 2

Per quanto riguarda l'ET-1, sebbene si siano riscontrati valori più elevati nelle classi con maggiore compromissione emodinamica (classi II e III rispetto alla classe Ib), i livelli plasmatici hanno mostrato un andamento meno lineare e comunque statisticamente non significativo (Grafico 3).

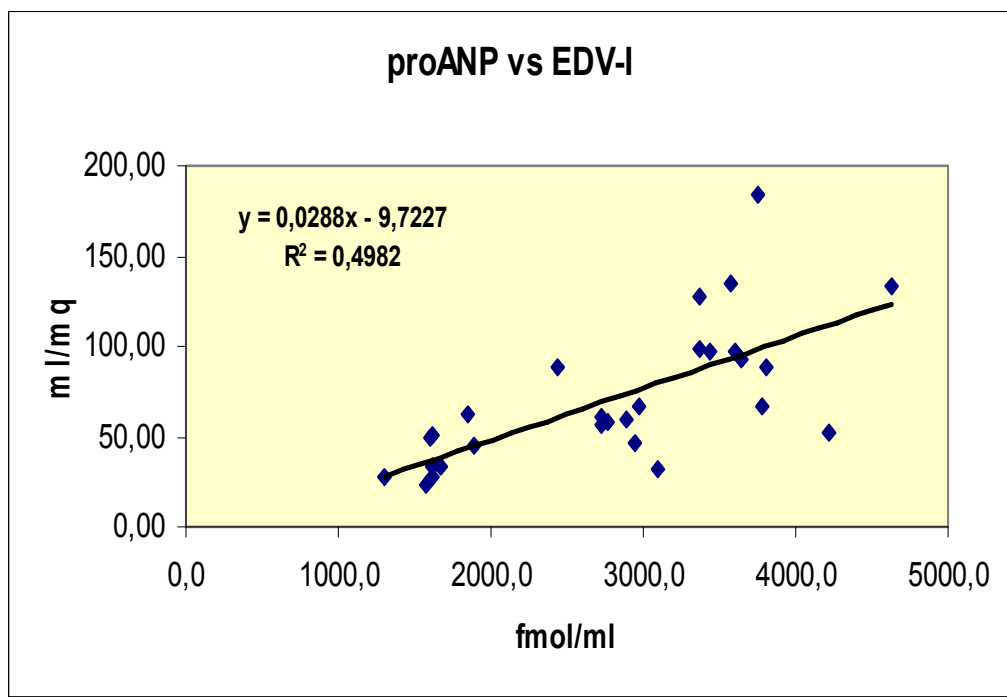


*Grafico 3*

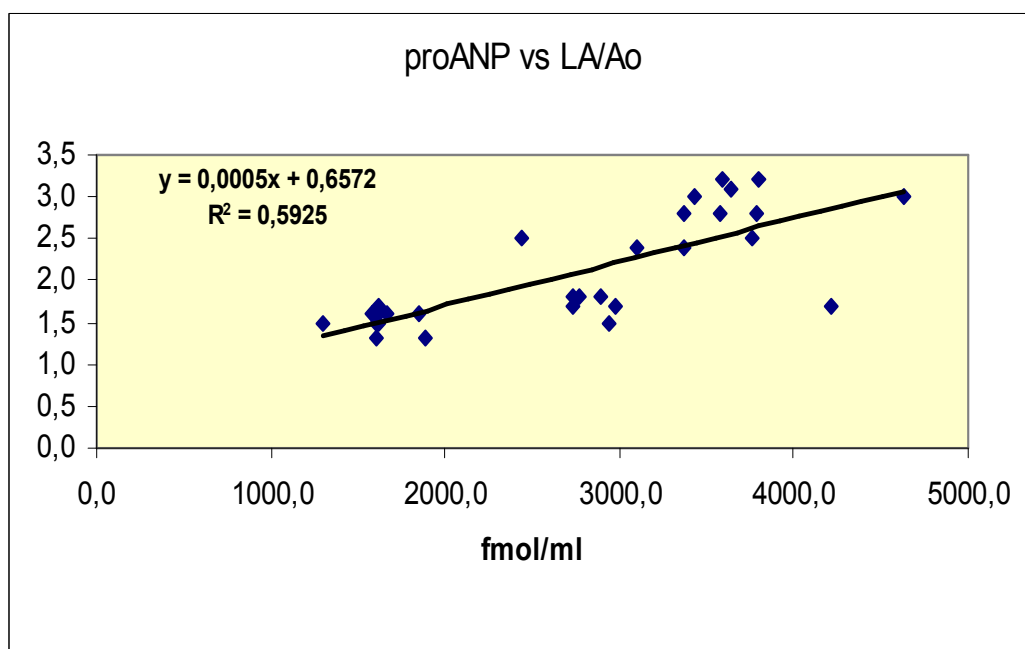


Infine, per quanto attiene l'analisi della regressione lineare, è stata rinvenuta una correlazione positiva tra le concentrazioni plasmatiche di entrambi i peptidi natriuretici, il rapporto atrio sinistro/aorta (LA/AO) e l'indice di sovraccarico volumetrico del ventricolo sinistro (I-EDV) (ANP:  $R^2=0.5925$ ,  $p \leq 0.01$ ; BNP:  $R^2=0.6058$ ,  $p \leq 0.01$ ) (*Grafici 4-7*).

Per quanto riguarda l'ET-1 non è stata rilevata alcuna correlazione significativa.



*Grafico 4*



*Grafico 5*

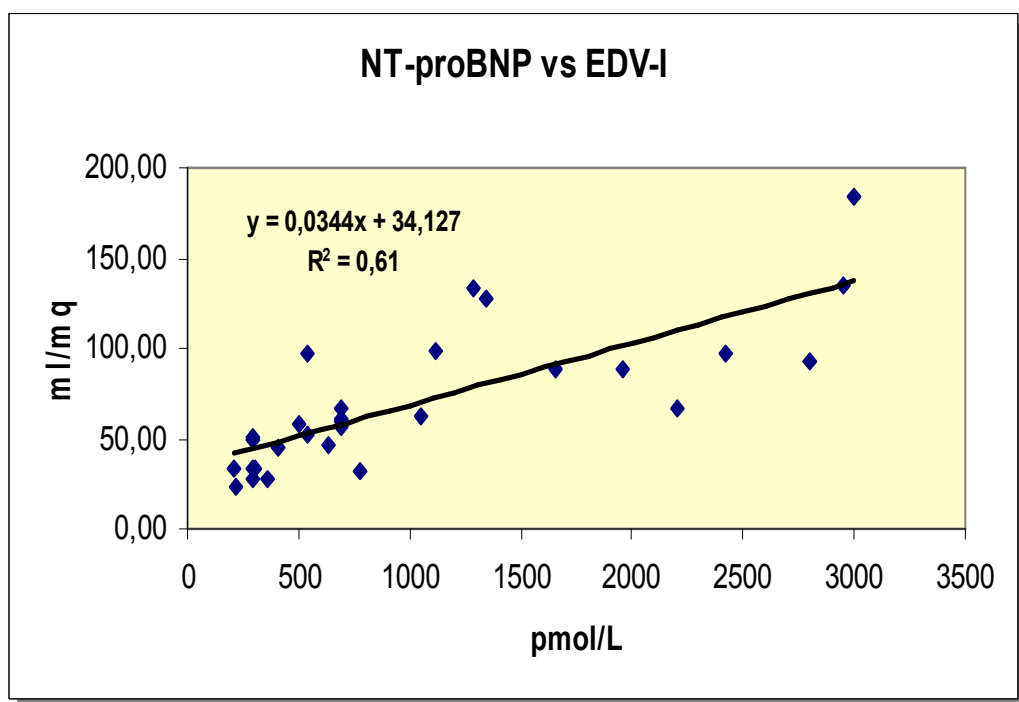


Grafico 6

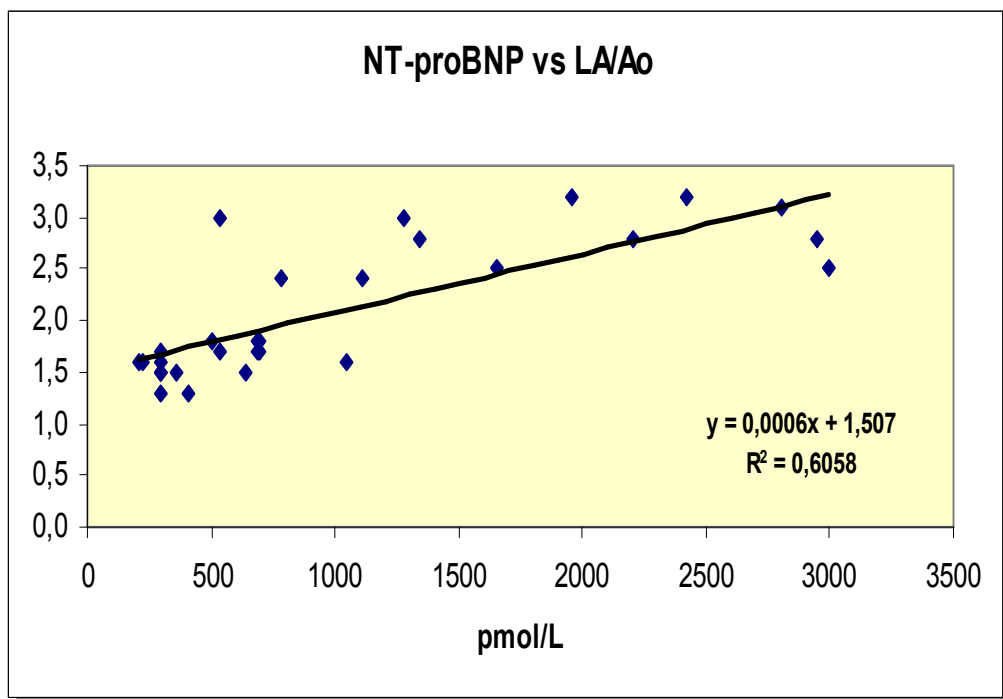


Grafico 7

## **Discussioni e Conclusioni**

Il termine di “marker biochimici di insufficienza cardiaca” viene comunemente impiegato per definire alcuni peptidi (ANP, BNP, TNF- $\alpha$ , ecc.), i cui livelli plasmatici appaiono correlati con lo stadio clinico e la condizione emodinamica, nonché con la prognosi dei pazienti affetti da patologie cardiache diverse.

Il biomarker cardiaco ideale potrebbe essere definito come una sostanza il cui dosaggio consente di diagnosticare la patologia cardiaca, svelare eventuali forme occulte, discriminare la dispnea cardiaca da quella su base respiratoria ed infine, fornire indicazioni prognostiche e terapeutiche.

In medicina umana il dosaggio dei peptidi natriuretici viene ormai eseguito di routine in campo cardiologico, rappresentando un valido

ausilio nel monitoraggio dei pazienti cardiopatici. Alla diffusione dell'utilizzo di tali biomarker ha contribuito senza dubbio la loro non invasività e la semplicità della determinazione analitica.

Nel cane, nonostante la presenza in commercio di kit diagnostici appositamente validati per questa specie, il loro inquadramento nell'ambito di un "planning" diagnostico per la gestione clinica del paziente cardiopatico appare ancora poco definito, necessitando di ulteriori verifiche cliniche.

Negli animali oggetto del presente studio, i dati relativi all'ANP confermano quelli riportati in precedenti ricerche, mostrando un progressivo incremento dei livelli plasmatici del peptide nell'ambito delle diverse classi ed in funzione della compromissione emodinamica, sebbene non si osservino variazioni statisticamente significative tra la classe III e la II. Tale dato potrebbe attribuirsi, verosimilmente,

all'adozione da parte di altri AA. di un differente sistema di classificazione dello scompenso cardiaco (NYHA – New York Heart Association), mutuato dalla medicina umana (Asano et al., 1999, Häggström et al., 2000).

Per quanto riguarda la concentrazione plasmatica di BNP, i nostri risultati dimostrano indubbiamente una migliore accuratezza nell'identificare le diverse classi di insufficienza cardiaca utilizzando la classificazione ISACHC. Attualmente in medicina umana il BNP rappresenta, per la sua sensibilità, il “marker” di insufficienza cardiaca maggiormente utilizzato per la stratificazione prognostica dei pazienti e come guida nella gestione della terapia. Inoltre, recenti studi in campo veterinario concordano con i nostri risultati, suggerendo come il BNP possa rappresentare un valido test aggiuntivo nei cani cardiopatici (Oyama et al., 2008).

Per quanto riguarda l'endotelina (ET1), in campo umano il suo dosaggio plasmatico fornisce importanti informazioni prognostiche in corso di insufficienza cardiaca da lieve a moderata (Pousset et al., 1997). In pazienti umani cardiopatici sono stati segnalati livelli elevati di ET-1, che appaiono correlati ad una maggiore mortalità. Analogamente in cani con insufficienza cardiaca congestizia sono state rinvenute concentrazioni plasmatiche di ET-1 più alte rispetto ad animali sani e cardiopatici asintomatici (Prosék et al., 2004). Nel nostro studio il dosaggio della ET-1 conferma la possibilità di individuare animali con grave scompenso cardiaco rispetto ai sani, ma le variazioni dell'ET-1 appaiono meno nette e prive di significatività statistica in funzione del peggioramento emodinamico, utilizzando lo schema di classificazione ISACHC. Questi dati appaiono in contrasto con quelli riportati da Tessier-Vetzel e coll. (2006), i quali hanno riscontrato una



significativa influenza della classe funzionale ISACHC sui livelli plasmatici di ET-1; ciò potrebbe trovare spiegazione nella differente metodica analitica impiegata (ELISA vs RIA). Attualmente sono necessari ulteriori studi al fine di poter inserire nella pratica clinica il dosaggio dell'ET-1 tra i biomarker in grado di stadiare la gravità dello scompenso cardiaco del cane.

In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti possiamo affermare che il BNP possiede nella specie canina una maggiore accuratezza diagnostica, rispetto ad altri biomarker, nel caratterizzare i pazienti con insufficienza cardiaca da malattia degenerativa della valvola mitralica e stratificati secondo il sistema ISACHC. Va infine sottolineato come i biomarker cardiaci non possano rappresentare l'unico elemento su cui basare la gestione dei pazienti cardiopatici e che il loro significato deve

essere sempre interpretato nell'ambito di una valutazione clinico-diagnostica completa ed articolata.

## **Bibiliografia**

Aguggini, G., Beghelli, V., Giulio, L.F., *“Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia”*. UTET,10; 671-673; 709-711, 1998.

Asano K., Masuda K., Okumura M., Kadosawa T., Fujnaga T., 1999.  
*“Plasma atrial and brain natriuretic peptide levels in dogs with congestive heart failure”*. Journal of Veterinary Medical Sciences, 61, 523-529.

Auslender M, *“Pathophysiology of pediatric heart failure”*. Progress in Pediatric Cardiology, 2000, 11, 175-184.

Bergler-Klein, J., Klaar, U., Heger, M., Rosenhek, R., Gabriel, H., Binder, T., Pacher, R., Maurer, G., Baumgartner, “*Big endothelin-1 is not a predictor in aortic stenosis, but is related to arterial blood pressure*”. International Journal of Cardiology, 2006, 10, 113, 174-180.

Biondo, A.W., Liu, Z.L., Wiedmeyer, C.E., de Moraes H.A., Sisson, D.D., Solter, P.F., “*Genomic Sequence and Cardiac Expression of Feline Atrial Natriuretic Peptide*”. American Journal of Veterinary Research, 2002, 63 (2), 236-240.

Boffa G., M., Zaninotto M., Bacchiega E., Nalli C., Forni M., Tiso E., Cacciavillani L., Razzolini R., Plebani M., “*Correlations between clinical presentation brain natriuretic peptide, big endothelin-1, tumor*

*necrosis factor-alfa, and cardiac troponins in heart failure patients”*

Italian Heart Journal, 2005, 6, 125-132.

Boswood A, J. Dukes-McEwan, Loureiro J, James R. A, Martin M,

Stafford-Johnson M, Smith P, Little C, Attree S: “*The diagnostic*

*accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine*

*cardiac disease”*. Journal of Small Animal Practice, 49, January, 26-32,

2008.

Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ Jr, et al: “*Pathophysiologically*

*relevant concentrations of TNF alfa promote progressive left*

*ventricular dysfunction and remodelling in rats”*. Circulation 97, 1382-

1391, 1998.

Braunwald, E., *“Heart disease”*, 4<sup>th</sup> edition. Saunders, 1991.

.

Buchanan JW., *“Chronic valvular disease (endocardiosis) in dogs”*

Adv Vet Sci Comp Med. **1977**;21:75-106.

Christoph Rubens, C., Ewert, R., Halank, M., Wensel, R., Orzechowski,

H.D., Schultheiss, H.P., Hoeffken, G., *“Big Endothelin-1 and*

*Endothelin-1 Plasma Levels Are Correlated With the Severity of*

*Primary Pulmonary Hypertension”*. Chest, 2001, 120, 1562-1569.

Clavell A. l., Stingo A., J., Wei C., M., Heubelin D., M., Burnett Jc

*“C-type natriuretic peptide: a selective cardiovascular peptide”* Am J

Physiol 1993Feb; 264 (2Pt 2) R 290-295.

Cowie, M.R., Struthers, A.D., Wood, D.A., Coats, A.J., Thompson, S.G., Poole-Wilson, P.A., Sutton, G.C., *"Value of natriuretic peptides in assessment of patients with possible new heart failure in primary care"*. Lancet, 1997, 350, 1349-53.

Davenport A. P., Ashby M.J., Easton P., Ella S., Bedford J., Dickerson C., Nunez DJ., Capper SJ., Beown MJ. *"A sensitive radioimmunoassay measuring endothelin-like immunoreactivity in human plasma comparision of levels in patients with essential hypertension and normotensive control subjects"* Clin Sci (Lond) 1990 Mar; 78 (3). 261-264.

De Francesco, T.C., Rush, J.E., Rozanski, E.A., Hansen, B.D., Keene, B.W., Moore, D.T., Atkins, C.E., *"Prospective clinical evaluation of an*



*ELISA B-type natriuretic peptide assay in the diagnosis of congestive heart failure in dogs presenting with cough or dyspnea*". Journal of Veterinary Internal Medicine, 2007, 21, 243-250.

De Luna, R., Ambrosio, R., Oliva, G., *"Ruolo dei fattori neuro-endocrini nella regolazione della funzione cardiovascolare in condizioni normali e patologiche"*. Acta Medica Veterinaria, 1994, 40, 333-353.

Debora M. Fine, Amy E. DeClue, Carol R. Reinero: *"Evaluation of circulating terminal-pro-B-type natriuretic peptide concentration in dogs with respiratory distress attributable to congestive heart failure or primary pulmonary disease"*. Journal of American Veterinary Medicine Association, 232, 11 June 1, 1674-1680, 2008.

Dei Cas, L., Metra, M., Visioli, O., *“La valutazione neurormonale nella insufficienza cardiaca: dal laboratorio sofisticato alle indicazioni pratiche”*. Giornale Italiano di Cardiologia, 1993, 23, 193-204.

Espiner, E.A., *“Physiology of natriuretic peptides”*. Journal of Veterinary Internal Medicine, 1994, 235, 527-54.

Espiner, E.A., Richards, A.M., Yandle, A.G., Nicholls, M.G., *“Natriuretic hormones”*. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 1995, 24, 481–509.

Ettinger, S.J., Feldman, E.C., *“Trattato di clinica medica veterinaria”*. Antonio Delfino Editore, 2001.

Feldman AM, Combes A, Wagner D, et al : *“The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure”*. J Am Coll Cardiol, 2000 Mar 1; 35(3):537-544.

Fontana F., Bernardi P., Lenzi S., *“Endothelins: a new family of peptides with biologic effects. Which is their physiopathologic role?”* G. Ital. Cardiol.1993 Jun 23 (6) 599-609.

Fortunato A., *“Biochimica dei marker di funzione cardiaca”* RIMeL/IJLaM 2005 1 56-62.

Francis GS, Goldsmith SR, Levine TB, et al: *“The neurohumoral axis in congestive heart failure”*. Ann. Intern. Med. 1984, 101: 370.

Gheorghiade, M., Benatar, D., Konstam, MA, Stoukides, CA, Bonow RO, “*Pharmacotherapy for systolic function: a review of randomized clinical trials*”. American Journal of Cardiology, 1997, 80, 14H-27H.

Gordon SG, Arsenault WG, Longnecker M, Boothe DM, Miller MW, Chalkley J. “*Pharmacodynamics of carvedilol in conscious, healthy dogs*”. J Vet Intern Med. 2006 Mar-Apr;20(2):297-304.

Hickey K A., Rubanyi G., Paul RJ., Highsmith RF “*Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells*” Am J Physiol. 1985 May; 248 (5pt 1) 550-556.

Haggstrom, J., Hansson, K., Karlberg, B.E., Kvart, C., Madej, A.,  
Olsson, K., *“Effects of long-term treatment with enalapril or  
hydralazine on the renin-angiotensin-aldosterone system and fluid  
balance in dogs with naturally acquired mitral valve regurgitation”*.  
American Journal of Veterinary Research, 1996, 57, 11, 1645-1652.

Haggstrom, J., Hansson, K., Karlberg, B.E., Kvart, C., Olsson, K.,  
Maeda, K., *“Plasma concentration of atrial natriuretic peptide in  
relation to severity of mitral regurgitation in Cavalier King Charles  
Spaniels”*. American Journal of Veterinary Research, 1994, 55 (5), 698-  
703.

Haggstrom, J., Hansson, K., Kvart, C., Duelund, Pedersen, H.,  
Vuolteenaho, O., Olsson, K., *“Relationship between different*

*natriuretic peptides and severity of naturally acquired mitral regurgitation in dogs with chronic myxomatous valve disease*". Journal of Veterinary Cardiology, 2000, 2, 7-16.

Hunt, P.J., Yandle, T.G., Nicholls, M.G., Richards, A.M., Espiner, E.A., "*The amino-terminal portion of pro-brain natriuretic peptide (pro-BNP) circulates in human plasma*". Biochemical and Biophysical Research Communications 1995, 214(3), 1175-83.

Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, et al: "*Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro*". J Mol Cell Cardiol 29: 859-870, 1997.

Kim S, Iwao H: "*Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases*". Pharmacol Rev, 2000, 52, 11.

Kittleson, M.D., Kienle, R.D., "*Small Animal Cardiovascular Disease*". Mosby, 1998.

Inoue A., Yanagisawa M., Takuwa Y., Mitsui Y., Kobayashi M., Masaky T., "*The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression*". J. Biol. Chem 1989 Sep. 5; 264 (25): 14954-9.

La Villa, G., Gentilini, P., in Cugini P., Guarini G., Fiorelli G., Lopez M., Violi E., Volpe M., “Teodori 2004 – *“Trattato Italiano di Medicina Interna”*. Società Editrice Universo, 2004.

Liu, Z.L., Wiedemeyer, C.E., Sisson, D.D., Solter, P.F., “*Cloning and characterization of feline brain natriuretic peptide*”. *Gene*, 2002, 12 (1-2), 183-90.

Loffler, B.M., “*Endothelin-converting enzyme inhibitors: current status and perspectives*”. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2000, 35 (4 suppl. 3), 79-82.

MacDonald, K.A., Kittleson, M.D., Munro, C., Kass, P., “*Brain natriuretic peptide concentrations in dogs with heart disease and*



*congestive heart failure*". Journal of Veterinary Internal Medicine, 2003, 17, 172-7.

Mann DL, Young JB: "*Mechanism in congestive heart failure: recognizing the role of proinflammatory cytokines*". Chest 105:897, 1994.

Martin MWS, "*Treatment of congestive heart failure-a neuroendocrine disorder*". Journal of Small Animal Practice, 2003, 44, 154-160.

Miyauchi, T., Masaki, T., "*Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system*". Annual Review of Physiology, 1999, 61, 391-415.

Moesgaard, S.G., Pedersen, L.G., Teerlink, T., Haggstrom, J., Pedersen, H.D., “*Neurohormonal and circulatory effects of short-term treatment with enalapril and quinalapril in dogs with asymptomatic mitral regurgitation*”. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2005, 19, 712-719.

Olsen LH, Fredholm M, Pedersen HD. “*Epidemiology and inheritance of mitral valve prolapse in Dachshunds*”. J Vet Intern Med. **1999** Sep-Oct;13(5):448-56.

Orloff, J., Berliner, R.N., “*Handbook of Physiology*”. American Physiology Society, Washington D.C., 1973.

Oyama M.A., Fox P.R., Rush J. E., Rozanski A., Lesser M.,. “*Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity*”.

Journal of American Veterinary Medical Association, 232, 1496-1503  
2008.

Packer M, “*Pathophysiology of chronic heart failure*”. Lancet, 1992,  
340, 88-92.

Paulson, S., Verhage, L., Mayer, D., Miller K., Schoenhard G., “*A nonequilibrium radioimmunoassay for angiotensin II*”. Journal of  
Pharmacological and Toxicological Methods, 1994, 32, 93-97.

Pedersen HD, Kristensen BO, Lorentzen KA, Koch J, Jensen AL, Flagstad A    *“Mitral valve prolapse in 3-year-old healthy Cavalier King Charles Spaniels. An echocardiographic study”*. Can J Vet Res. 1995 Oct; 59 (4) : 294-8.

Porciello F. *“Elettrocardiografia nel cane, nel gatto e nel cavallo”*. Manuali pratici di Veterinaria. Collana diretta da Vincenzo Appicciutoli. 2003 Poletto Editore s.r.l.

Prošek, R., Sisson, D.D., Oyama, M.A., Biondo A.W., Solter P.E., *“Measurements of plasma endothelin immunoreactivity in healthy cats and cats with cardiomyopathy”*. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2004, 18, 6, 826-830.

Prošek, R., Sisson, D.D., Oyama, M.A., Biondo A.W., Solter P.E.,  
*“Plasma endothelin-1 concentrations in healthy dogs and dogs with  
acquired heart disease”*. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2004,  
18, 6, 840-844.

Prošek, R., Sisson, D.D., Oyama, M.A., Solter P.E., *“Use of plasma  
ANP, BNP, endothelin-1 and troponin-I levels in distinguish between  
cardiac and non-cardiac causes of acute dyspnea in dogs”*. Journal of  
Veterinary Internal Medicine, 2004, 18, 40.

Pousset F., Isnard R., Lechat P., Kalotka H., Carayon A., Maistre G.,  
Escolanos S., Thomas D., Komajda M., *“Prognostic value of plasma  
endothelin-1 in patients with chronic heart failure”*. European Heart  
Journal, 18, 254-258. 1997.

Rossi, G.P., Sacchetto, A., Cesari, M., Pessina, A.C., *“Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system”*. Cardiovascular Research, 1999, 43, 300-307.

Rubens C., Ewert R., Holank M., Wensel R., Orzechowski HD., Schulteheiss HP., Hoefken G. *“Big endothelin –1 and endothelin –1 plasma levels are correlated with severity of primary pulmonary hypertension”*. Chest, 2001 Nov; 120 (5) 1562-69.

Sadoshima J-I, Izumo S: *“Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: critical role of the AT<sub>1</sub> receptor subtype”*. Circ. Res 73: 413, 1993.

Schellenberg S., Grenacher B., Kaufmann K., Reusch C., E., Glaus T., M., *“Analytical validation of commercial immunoassays for the measurement of cardiovascular peptides in the dog”* The Veterinary Journal, 2007, Article in press.

Sharma R, Coats AJ, Anker SD: *“The role of inflammatory mediators in chronic heart failure. Cytokines, nitric oxide, and endothelin-1”*. Int J Cardiol 72: 175, 2000.

Sisson DD, *“Neuroendocrine evaluation of cardiac disease”*. Veterinary Clinics Small Animal Practice, 2004, 34, 1105-1126.

Studio Copernicus: *“Il Carvedilolo riduce la gravità dell'insufficienza cardiaca e la morbidità”*. Packer M et al, Circulation 2002; 106:2194-2199.

Sudoh, T., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., *“Brain natriuretic peptide-32: N-terminal six amino acid extended form of brain natriuretic peptide identified in porcine brain”*. Biochemical Biophysical Research Communication, 1988, 155, 726-32.

Swenson L, Häggström J, Kvarfven C, Juneja RK: *“Relationship between parental cardiac status in Cavalier King Charles spaniels and prevalence and severity of chronic valvular disease in offspring”*. J Am Vet Med Assoc. 1996 Jun 15;208(12):2009-12.



Taddei S., Versari D., Cipriano A., Ghiadoni L., Galetta F., Franzoni F.,

Magagna A., Viridis A., Salvetti A. *“Identification of a cytochrome P450*

*2C9-derived endothelium-derived hyperpolarizing factor in essential*

*hypertensive patients”*. J Am. Coll Cardiol. 2006 Aug;; 48 (3) 508-515.

Talwar S, Siebenhofer A, Williams B, Ng L: *“Influence of*

*hypertension, left ventricular hypertrophy, and left ventricular systolic*

*dysfunction on plasma N terminal proBNP”*. Heart, 2000, 83: 278.

Tessier-Vetzel D, Tissier R, Chetboul V, Carlos C, Nicolle A, Benbaron

D, Dandrieux J, Thoulon F, Carayon A, Pouchelon JL.: *“Diagnostic*

*and prognostic value of endothelin-1 plasma concentrations in dogs*

*with heart and respiratory disorders”*. Vet. Rec. 2006 Jun

10;158(23):783-8.

Vittorini S., Masini M., Clerico A., *“I Peptici Natriuretici Cardiaci”*.

Minerva Medica, 2006, 97, 79-93.

Wei CM, Heublein DM, Perrella MA, et al: *“Natriuretic Peptide system in human heart failure”*. Circulation, 1993, 88: 1004.

Wei, C.M., Lerman, A., Rodeheffer, R.J., McGregor, C.G., Brandt, R.R., Wright, S., Heublein, D.M., Kao, P.C., Edwards, W.D., Burnett Jr, J.C., *“Endothelin in human congestive hearth failure”*. Circulation, 1994, 89, 1580-1586.

Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Goto K., Masaki T., *“A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular*

*endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels*". J

Hyperthens. Suppl. 1988 Dec; 6 (4) S 1 88-91.

Yandle, A.G., "*Physiology of natriuretic peptides*". Journal of

Veterinary Internal Medicine, 1994, 235, 527-41.